

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

MARIA EMMANOELE DAMARES OLIVEIRA DE LEMOS

**Cultivo da Microalga *Botryococcus braunii* Usando Fontes Alternativas de Carbono
para a Produção de Biocompostos em Biorrefinarias**

Lorena
2024

MARIA EMMANOELE DAMARES OLIVEIRA DE LEMOS

Cultivo da Microalga *Botryococcus braunii* Usando Fontes Alternativas de Carbono para a Produção de Biocompostos em Biorrefinarias

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Desenvolvimento de Produtos e Processos.

Orientador: Prof. Dr. Messias Borges Silva.

Lorena

2024

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

69

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Lemos, Maria Emmanoele Damares Oliveira
Cultivo da Microalga Botryococcus Braunii Usando
Fontes Alternativas de Carbono para a Produção de
Biocompostos em Biorrefinarias / Maria Emmanoele
Damares Oliveira de Lemos; orientador Messias Borges
Silva - Versão Corrigida. - Lorena, 2024.
69 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química na Área de
Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
2024

1. Botryococcus braunii. 2. Biomassa. 3. Lipídios.
4. Biorrefinarias. 5. Planejamento de
experimentos. I. Título. II. Silva, Messias Borges ,
orient.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a lei da causalidade por ter colocado no meu caminho tantas pessoas maravilhosas e tantas oportunidades de crescimento pessoal, profissional e espiritual. Agradeço ao apoio e amor da minha família. Agradeço a instituição de ensino EEL-USP e ao meu orientador, Messias Borges, pela oportunidade de me tornar uma mulher da ciência.

RESUMO

LEMOS, M. E. D. O. Cultivo da Microalga *Botryococcus braunii* Usando Fontes Alternativas de Carbono para a Produção de Biocompostos em Biorrefinarias. 2024. 69 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2024.

O presente trabalho analisou cinco fontes de carbono diferentes (chorume, nitrato de sódio, bicarbonato de sódio, melão e nitrato de sódio) usando o meio WC no fotobiorreator Airlift de bancada (3,8L de volume útil), usando iluminação com lâmpadas LED de 18 W potência e aeração com filtros (Aquarium Air Pump daXilong) de 5 W de potência por 24h/dia em uma sala refrigerada a 20°C, com o objetivo de avaliar o crescimento e teor lipídico da microalga *Botryococcus braunii* no conceito de biorrefinarias. Os principais resultados encontrados foram os teores lipídicos no valor de 60,88% , 42,33% , 35,76% e 27,9% em condições experimentais diferentes, sendo o experimento 2 (presença de bicarbonato de sódio, melão e acetato de sódio) o de maior valor. A análise da ANOVA mostrou relevância nos dados referente a produtividade volumétrica em biomassa seca, sendo seus maiores valores para a presença de acetato de sódio e chorume, e na ausência de nitrato de sódio, tendo o seu máximo no experimento 6 com 71.033 mg.L⁻¹.d⁻¹. O rendimento máximo da cultura foi de 6,050 x 10⁶ células mL⁻¹ no experimento 8 (fatores presentes: chorume, nitrato, bicarbonato e acetato de sódio). Já para a produtividade volumétrica lipídica, os maiores valores foram para a presença das variáveis bicarbonato de sódio, melão e acetato de sódio, sendo o experimento 2 com 41,52mg.L⁻¹.d⁻¹o maior volume. O pH dos cultivos não foram controlados e variaram de pH=8 até pH=10, essa mudança de pH não mostrou influenciar no crescimento da *Botryococcus braunii* .

Palavras-chave: *Botryococcus braunii*. Biomassa. Lipídios. Biorrefinarias. Planejamento de Experimentos.

ABSTRACT

LEMOS, M. E. D. O. Cultivo da Microalga *Botryococcus braunii* Usando Fontes Alternativas de Carbono para a Produção de Biocompostos em Biorrefinarias. 2024. 69 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2024.

The present work analyzed five different carbon sources (slurry, sodium nitrate, sodium bicarbonate, molasses and sodium nitrate) using the WC medium in the benchtop Airlift photobioreactor (3.8L useful volume), using lighting with LED lamps. 18 W of power and aeration with filters (Aquarium Air Pump from Xilong) of 5 W of power for 24 hours/day in a refrigerated room at 20°C, with the aim of evaluating the growth and lipid content of the microalgae *Botryococcus braunii* in the biorefinery concept. The main results found were lipid levels of 60.88%, 42.33%, 35.76% and 27.9% in different experimental conditions, with experiment 2 (presence of sodium bicarbonate, molasses and sodium acetate). sodium sodium) the highest value. The ANOVA analysis showed relevance in the data regarding volumetric productivity in dry biomass, with its highest values being for the presence of sodium acetate and leachate, and in the absence of sodium nitrate, having its maximum in experiment 6 with 71,033 mg.L⁻¹.d⁻¹. The maximum culture yield was 6,050 x 10⁶ cells mL⁻¹ in experiment 8 (factors present: leachate, nitrate, bicarbonate and sodium acetate). As for volumetric lipid productivity, the highest values were for the presence of the variables sodium, molasses and sodium acetate, with experiment 2 having 41.52mg.L⁻¹.d⁻¹st largest volume. The pH of the cultures was not controlled and varied from pH=8 to pH=10, this change in pH did not influence the growth of *Botryococcus braunii*.

Keywords: *Botryococcus braunii*. Biomass. Lipids. Biorefineries. Design of Experiments.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Mercado para produtos derivados de microalgas.....	19
FIGURA 2 - <i>Botryococcus braunii</i> vista ao microscópio.....	22
FIGURA 3 - Características das colônias de <i>Botryococcus braunii</i>	22
FIGURA 4 - Esquema do metabolismo de microalgas.....	23
FIGURA 5 - Fluxograma de uma biorrefinaria de microalgas.....	32
FIGURA 6 - Diagrama esquemático do sistema de cultivo utilizado para o crescimento da microalga <i>C. minutissima</i> 26a. Fotobiorreator airlift com Tubos concêntricos (a), detalhes do sistema airlift interno (b).....	38
FIGURA 7 - Fotobiorreatores utilizados no cultivo, operando no laboratório de engenharia de microalgas (DEQUI - USP).....	38
FIGURA 8 - Estrutura de manutenção de cepas de microalgas.....	40
FIGURA 9 - Esquema do aumento celular- Repicagens.....	41
FIGURA 10 - Béquer com biomassa floculada.....	43
FIGURA 11 - Sistema para filtração da biomassa.....	44
FIGURA 12 - Esquema de Erlenmeyers em ultrassom.....	46
FIGURA 13 - Filtração da biomassa e separação de fases.....	46
FIGURA 14 - Separação de fases e recolhimento em vidro amostra da parte apolar..	47
FIGURA 15 - Formação de colônias da <i>B. Braunii</i>	48
FIGURA 16 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a variável resposta da Produtividade volumétrica em biomassa.....	53
FIGURA 17 - Gráfico box-plot para a variável Chorume.....	54
FIGURA 18 - Gráfico box-plot para a variável Nitrato de sódio.....	55
FIGURA 19 - Gráfico box-plot para a variável acetato de sódio.....	56
FIGURA 20 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a variável resposta da Produtividade em lipídios.....	58
FIGURA 21 - Gráfico box-plot para a variável acetato de sódio.....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de energia e eficiência fotossintética de diferentes fontes de biomassa.	16
Tabela 2 - Composição química de diferentes espécies de microalgas.....	18
Tabela 3 - Teor de óleo de algumas microalgas.....	21
Tabela 4 - Composição do melão de cana-de-açúcar.....	29
Tabela 5 - Composição meio WC.....	37
Tabela 6 - Fatores considerados no planejamento de experimentos e seus respectivos níveis.	42
Tabela 7 - Matriz experimental L8 de Taguchi.....	42
Tabela 8 - Rendimento máximo da altura.....	49
Tabela 9 - Variação do pH durante o cultivo no fotobiorreator.....	49
Tabela 10 - Concentração (mg.L^{-1}) de biomassa microalgal.....	50
Tabela 11 - Teor lipídico (%) presente na biomassa microalgal.....	52
Tabela 12 - Resposta para determinação da Produtividade volumétrica em biomassa ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).....	52
Tabela 13 - Efeito dos Fatores sobre a Produtividade em Biomassa.....	53
Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para a produtividade biomassa.....	57
Tabela 15 - Resposta para determinação da Produtividade em lipídeos ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).....	57
Tabela 16 - Efeito dos Fatores sobre a Produtividade lipídica.....	58
Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) para a produtividade lipídica.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Fatores que influenciam o crescimento das microalgas	24
Quadro 2 - Nutrientes e suas funções no metabolismo das microalgas.....	27
Quadro 3 - Resumo das diferenças entre biorrefinarias e refinarias.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Justificativas	14
2 OBJETIVOS	15
3 REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1 Microalgas	16
3.2 Microalgas: composição química, produtos e aplicações	18
3.3 Microalga <i>Botryococcus braunii</i>	20
3.4 Metabolismo	22
3.5 Fatores que influenciam o crescimento celular	25
3.5.1 pH	25
3.5.2 Nutrientes (suplementação)	26
3.5.3 Luz	27
3.5.4 Aeração	27
3.5.5 Temperatura	28
3.6 Fontes alternativas de carbono orgânico	28
3.6.1 Melaço	28
3.6.2 Chorume	29
3.7 Tecnologias de cultivo	30
3.8 Biorrefinarias	31
3.9 Método de Taguchi	33
3.9.1 Funcionamento do Método de Taguchi	33
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1.1 Microalga <i>Botryococcus braunii</i>	36
4.1.2 Reagentes	36
4.2 Equipamentos	37
4.2.1 Fotobiorreator airlift	37

4.2.2	Outros equipamentos	39
4.3	Procedimentos	39
4.3.1	Preparação dos materiais e equipamentos	39
4.3.2	Inóculos e Repicagem	39
4.3.3	Planejamento Experimental	41
4.3.4	Acompanhamento dos cultivos	42
4.3.5	Colheita, floculação e filtração da biomassa	43
4.3.6	Pré-tratamento da biomassa (secagem e trituração)	44
4.3.7	Cálculo da produtividade em biomassa	44
4.3.8	Rendimento Máximo da cultura (R)	45
4.3.9	Extração de lipídeos	45
4.3.10	Cálculo do teor de lipídios	47
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES - PARCIAIS	48
5.1	Crescimento da <i>Botryococcus braunii</i> no fotobiorreator airlift	48
5.2	Concentração da biomassa migroalgal	50
5.3	Teor lipídico	51
5.4	Planejamento Experimental	52
5.4.1	Produtividade volumétrica em biomassa ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	52
5.4.2	Produtividade lipídica ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$)	57
6	CONCLUSÕES	61
7	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

A redução das reservas de petróleo associado ao crescente aumento da concentração de CO₂ na atmosfera, tem aumentado o interesse comercial em desenvolver tecnologias para a produção de combustíveis e outros compostos a partir de fontes renováveis (LIU *et al.*, 2021).

Uma biorrefinaria é uma instalação projetada para utilizar uma ampla variedade de matérias-primas de forma integral para a obtenção de produtos de valor agregado e vetores energéticos. A plataforma de biorrefinaria de microalgas fornece uma excelente alternativa para a síntese de vários novos produtos, os biocompostos, e aumenta a valorização e aproveitamento da biomassa (GIRALDO *et al.*, 2020).

Microalgas podem ser cultivadas em larga escala em sistemas fechados (fotobiorreatores) ou em sistemas abertos (lagoas com canaleta), com taxa de crescimento mais rápida do que as plantas terrestres, com necessidade mínima de terra arável, utilização de águas residuais e sequestro de CO₂. O que as tornam atraentes para o mercado (RUANGSOMBOON, 2012).

As microalgas possuem grande potencial para a produção de grande quantidade de lipídios, proteínas, carboidratos, pigmentos etc. Que variam consideravelmente para as diferentes espécies, sendo influenciados pelo sistema de cultivo. Além disso, outras condições influenciam, tais como: composição do meio, temperatura, intensidade da iluminação, fotoperíodo e taxa de aeração (CHU *et al.*, 2021).

A microalga *Botryococcus braunii* é amplamente reconhecida como uma matéria-prima de biocombustível potencialmente importante cuja exploração comercial é limitada por dificuldades com seu cultivo e colheita. Ela é conhecida e procurada por sua habilidade de sintetizar e acumular uma variedade de lipídeos e hidrocarbonetos. Para o crescimento do *B. braunii* é necessária a presença de água, luz, CO₂, quantidade e qualidade de nutrientes inorgânicos (AL-HOTHALY *et al.*, 2015; BANERJEE *et al.*, 2002).

Nesse contexto, o trabalho propôs o estudo do cultivo da microalga *Botryococcus braunii* sob condições controladas (temperatura, CO₂ e iluminação constantes), variando os substratos, visando a maior produção de biomassa, produtividade em biomassa e maior teor lipídico.

1.1 JUSTIFICATIVAS

As microalgas possuem um grande campo de aplicação industrial. Tradicionalmente utilizada por povos antigos como alimento, as microalgas são capazes de produzir lipídeos que podem ser transformados em combustíveis, produzir proteínas bioativas, pigmentos que podem ser usados na indústria farmacêutica, entre outras aplicações. Isso é por causa da versatilidade metabólica destes microrganismos, pois são capazes de se adaptar a diversas condições de cultivo (pH, temperaturas, presença ou ausência de carbono orgânico e outros). (CHEW *et al.*, 2017).

É estimada cerca de 200k a 800k de espécies de microalgas, dentre as quais apenas 35k estão descritas. Temos, então, uma grande oportunidade a exploração desta biodiversidade, sendo difícil prever os possíveis benefícios ambientais e econômicos que podem ser gerados (CHEW *et al.*, 2017).

A *Botryococcus braunii* é conhecida por seu alto rendimento de hidrocarbonetos extracelulares e polissacarídeos que podem ser usados não apenas como combustíveis, mas também como matéria-prima alternativa para outros produtos de base fóssil. Entretanto, é um campo desafiador devido às dificuldades para desenvolvimento de cultivos produtivos. É possível melhorar a economia de produção da microalga fazendo estudo de sistemas de cultivo adequado. Além disso, a investigação de vias metabólicas para *Botryococcus braunii* ajuda a entender sua regulamentação e fornece informações valiosas para seleção de cepas e produção ideal de produtos químicos de alto valor (FERREIRA *et al.*, 2021).

2 OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo principal melhorar o cultivo de *Botryococcus braunii*, utilizando o chorume, nitrato de sódio, bicarbonato de sódio, melão e acetato de sódio como fonte de carbono, avaliando seus efeitos na produção sustentável de bioprodutos com sua inclusão no conceito de biorrefinarias.

Para o desenvolvimento deste projeto estão previstos os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o crescimento da *Botryococcus braunii* cultivadas em chorume, em reator tipo Airlift, para diferentes meios de processo.
- Usar os substratos: Chorume, nitrato de sódio, bicarbonato de sódio, melão e acetato de sódio.
- Otimizar o meio de cultivo de *Botryococcus braunii* estudando as condições que otimizem seu crescimento em termos de produtividade de biomassa seca e produtividade lipídica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 MICROALGAS

As microalgas são um dos biorrecursos mais importantes que atualmente estão recebendo muita atenção devido a uma multiplicidade de razões. Estes microrganismos se encontram em praticamente todos os biótipos, pela sua diversidade ecológica e adaptabilidade fisiológica, sobretudo em meios aquáticos (águas doces, salgadas e salobras) mas também podem habitar outros meios, nascentes quentes, superfície úmida de rochas, deserto, neve, o ar (RAWAT *et al.*, 2011).

Além da grande disponibilidade desses microrganismos, outra grande vantagem é a capacidade de cumprir um duplo papel de biorremediação de efluentes e de gerar biomassa para produção de biocompostos com concomitante sequestro de dióxido de carbono. Podemos mencionar também, que a remediação de efluentes por microalgas é um processo ecologicamente correto, sem poluição secundária, desde que a biomassa produzida seja reutilizada e permita a reciclagem eficiente de nutrientes (RAHEEM *et al.*, 2018; RUIZ *et al.*, 2016).

Nas Tabela 1 pode-se notar a maior eficiência fotossintética das microalgas em relação aos vegetais superiores (FRANCO *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Produção de energia e eficiência fotossintética de diferentes fontes de biomassa.

Fonte de biomassa	Tipo de combustível produzido	Produtividade (bep/ha.ano)	Eficiência fotossintética (%)
Milho	Etanol	20	0,2
Cana-de-açúcar	Etanol	210 - 250	2 - 3
Soja	Biodiesel	13 - 22	0,1 - 0,2
Girassol	Biodiesel	8,7 - 16	0,1 - 0,2
Microalgas	Biodiesel	390 - 700	4 - 7

Fonte: (FRANCO *et al.*, 2013)

Existe uma forte semelhança entre plantas e algas, morfologicamente, no entanto as

algas não apresentam raízes, folhas e rede vascular, enquanto que as plantas mostram essas características de modo que a diferença entre ambas seja considerada bastante alta. Qualquer organismo com talo e clorofila não diferenciados em raízes, caule e folhas é considerado como sendo uma alga (RICHMOND, 2004; BARSANTI; GUALTIERI, 2006).

Microalga é um termo que se refere a microrganismos fotossintéticos, algas microscópicas e bactérias oxigenadas, eucariotas e procariotas (cianobactérias) capazes de produzir proteínas, lipídios e hidratos de carbono em resultado da fotossíntese que realizam. Devido a sua estrutura multicelular simples ou unicelular, conseguem viver em condições rigorosas, crescer rapidamente e, embora sejam de vida livre, um determinado número de microalgas vive em associação simbiótica com uma variedade de outros microrganismos (RICHMOND, 2004)

Pode ser encontrada em todos os ecossistemas terrestres existentes, mais comumente na água (marinha ou água doce), mostrando uma ampla gama de tolerância de pH, turbidez, temperatura e concentrações de O₂ e CO₂, com isso representa uma alta variedade de espécies que vivem em condições ambientais diversificada (LEE,2008).

Na maioria dos habitats funcionam como fonte básica de alimentos para a cadeia alimentar, produzindo água, CO₂ e material orgânico a partir da luz solar. Fixam CO₂ utilizando energia solar, precisando do mínimo de recursos para manter as suas estruturas e para sobreviver, utilizam diferentes metabolismos energéticos, tais como a respiração, fotossíntese e assimilação/fixação de azoto, sendo, por isso, considerados organismos com elevado potencial biotecnológico. Algumas espécies apresentam a capacidade de utilizar diferentes vias metabólicas: autotrófico, heterotrófico e mixotrófico (descritos na seção 3.4) (ORTENZO, *et al.*, 2015; SCHMITZ *et al.*, 2012).

Tem-se uma estimativa da existência de mais de cem mil espécies diferentes de microalgas, encontrando-se divididas em diversas classes, sendo diferenciadas principalmente pelo ciclo de vida, pela pigmentação e estrutura básica celular. Sobre as classes mais importantes em utilização de substratos orgânicos, temos três, nomeadas resíduos agroindustriais, são as diatomáceas (Bacillariophyceae), as algas verdes (Chlorophyceae) e as algas douradas (Chrysophyceae) (DERMIBAS, A.; DERMIBAS, M.F. 2009).

3.2 MICROALGAS: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, PRODUTOS E APLICAÇÕES

O grupo das microalgas agrupa microrganismos eucariotos e procariotos e são organismos fotossintéticos. A grande maioria fitoplanctônica, onipresentes na natureza que são conhecidos como produtores primários e fornecem alimento para muitos animais aquáticos. O tamanho das microalgas varia entre 20-200 μm . O número de espécies de algas pode exceder os milhões e as microalgas constituem a maior parte (MISHRA; TIWARI; MAHMOUD, 2022).

As microalgas são ubiqüitárias e apresentam diversas características, como: podem ser filamentosas, coloniais e unicelulares. Elas são conhecidas como a forma mais primitiva na terra e adaptam bem em diversos ambientes, estão distribuídas em sua maioria nos ambientes aquáticos, desde rios de água doce (90%) até lagos salgados, mas são encontradas também em solos terrestres (SHAH *et al.*, 2017). As microalgas podem ou não apresentar motilidade; podem viver em associação simbiótica, mas a maioria é de vida livre; e têm grande tolerância para uma ampla faixa de temperatura, turbidez, pH e concentração de CO_2 e O_2 (AMIT; GHOSH, 2018).

Sendo os principais organismos fotoautotróficos produtores de carbono orgânico nos mares e águas de interiores, este grupo heterogêneo constitui a base da cadeia trófica de ecossistemas aquáticos. As microalgas são ricas em proteínas, carboidratos e lipídios (Tabela 2) (MISHRA; TIWARI; MAHMOUD, 2022; MENETREZ, 2012).

Tabela 2 - Composição química de diferentes espécies de microalgas

Espécie de Microalga	Proteína %	Carboidrato %	Lipídeos %
<i>Botryococcus braunii</i>	4	20	80
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	5	16	84
<i>Chlorella vulgaris</i>	58	17	22
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11

Fonte: Adaptado MENETREZ (2012).

As microalgas como alimento estão se popularizando devido aos seus altos valores nutricionais e benefícios à saúde. É relatado que as microalgas também são uma rica fonte de vitaminas e minerais como vitamina A, B1, B2, C e E ácido fólico, magnésio, ferro, iodo, cálcio, etc. que são benéficos para o consumo de animais e alguns para humanos (BROWN; BLACKBURN, 2013).

Eles também produzem alto teor de biomassa e óleo em condições favoráveis que os tornam mais desejáveis para a produção de biocombustíveis e outros biocompostos úteis para biorrefinarias (CHEW *et al.*, 2017; TIWARI; MARELLA, 2019).

Além dos lipídios, as microalgas também são ricas em pigmentos, proteínas e carboidratos essenciais para ter uma boa saúde, temos como exemplo pigmentos e proteínas que são usados na indústria farmacêutica para tratamento de doenças específicas, e os carboidratos sendo usados no processo de fermentação e de longa duração.

Existem também os compostos bioativos derivados de microalgas possuindo uma ampla gama de atividades biológicas como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antineoplásica, antiincrustante, antioxidante, antiinflamatória, anticoagulante e antienzimática (MISHRA; TIWARI; MAHMOUD, 2022), e os ácidos graxos de cadeia são usados como suplementos de saúde (CHEW *et al.*, 2017).

Figura 1 - Mercado para produtos derivados de microalgas

<p>Aplicações</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nutrição Humana e animal - Biomédica (corantes) <p>Exemplos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Astaxantina / Cataxantina - Ficocianina <p>Pigmentos</p> 	<p>Aplicações</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nutrição Humana e Animal - Cosméticos (antioxidantes) <p>Exemplos</p> <ul style="list-style-type: none"> - EPA - DHA <p>Ácidos graxos poli-insaturados</p> 	<p>Aplicações</p> <ul style="list-style-type: none"> - Cosméticos (filtros solares) <p>Exemplo</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Porphyra</i> <p>Aminoácidos tipo micosporinas</p> 
<p>Aplicações</p> <ul style="list-style-type: none"> - Alimentos (estabilizantes) - Biomédica /farmacêutica <p>Exemplos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ágar - Carragenina / Alginato <p>Ficocoloides</p> 	<p>Aplicações</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nutrição Animal (aquicultura) <p>Exemplo</p> <ul style="list-style-type: none"> - Fitosterol <p>Esteróis</p> 	<p>Aplicações</p> <ul style="list-style-type: none"> - Nutrição Humana e Animal <p>Exemplos</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Chlorella</i> - <i>Spirulina</i> <p>Aminoácidos e proteínas</p> 
<p>Aplicações</p> <ul style="list-style-type: none"> - Etanol - Bioplásticos - Blocos construtores químicos <p>Carboidratos</p> 	<p>Aplicações</p> <ul style="list-style-type: none"> - Biodiesel e bioquerosene - Surfactantes - Lubrificantes - Polímeros <p>Lipídeos</p> 	<p>Aplicações</p> <ul style="list-style-type: none"> - Biogás e energia - Fertilizantes - Biofixação de CO₂ e tratamento de efluentes <p>Biomassa</p> 

Fonte: (BRASIL; GARCIA, 2016)

As microalgas desempenham um papel importante na remediação de águas residuais, removendo carbono, nitrogênio, fósforo e metais pesados de ambientes aquáticos e de lixiviados (PLÖHN *et al.*, 2021). A figura 1 mostra resumidamente os produtos e aplicações das microalgas como alternativas promissoras para a indústria.

3.3 MICROALGA *BOTRYOCOCCUS BRAUNII*

Botryococcus braunii é um tipo especial de microalga, que é conhecida pelas seguintes características que as diferenciam das outras: alta produção de hidrocarbonetos extracelulares, alta produção de lipídeos e a produção lipídica extracelular. Essa última característica se deve às consecutivas divisões celulares, formando paredes celulares onde alguns hidrocarbonetos são estocados (SINGH, S.P.; SINGH, P. 2015).

Segundo Chisti (2007) essa microalga por apresentar um alto teor lipídico é bastante desejada para produção de biodiesel. Na Tabela 3 pode-se ver o teor de algumas microalgas, incluindo a *Botryococcus braunii*.

A estrutura da *Botryococcus braunii* é complexa e única, contendo uma camada fixa de polissacarídeos extracelulares que forma a parede externa da célula com dobras entre as células individuais, o que bloqueia o extravasamento de hidrocarbonetos extracelulares da matriz celular da colônia. Caracterizada por uma organização de células individuais com formato de gota levemente arredondadas (Figura 2) que são mantidas juntas por uma matriz contendo lipídeos (BANERJEE *et al.*, 2002). Gotas de óleo podem ser excretadas da matriz devido a pressão da lamínula, sendo possível notar durante o cultivo a presença de óleo no meio. Depois da divisão celular, cada célula secreta uma nova parede dentro da parede da célula mãe, assim a matriz parece estar composta por paredes sucessivas e saturadas com óleo. As células ao final da fase exponencial contém numerosos cloroplastos com tilacoides arrumados paralelamente com a superfície da célula e poucos grânulos de amidos presentes.

Tabela 3 - Teor de óleo de algumas microalgas.

Microalga	Teor de óleo (% em peso seco)
<i>Botryococcus braunii</i>	25 - 75
<i>Clorela sp.</i>	28 - 32
<i>Crypthecodinium cohnii</i>	20
<i>Cylindrotheca sp.</i>	16 - 37
<i>Dunaliella primolecta</i>	23
<i>sochrysis sp.</i>	25 - 33
<i>Monallanthus salina</i>	> 20
<i>Nannochloris sp.</i>	20 - 35
<i>Nannochloropsis sp.</i>	31 - 68
<i>Neochloris oleoabundans</i>	35 - 54
<i>Nitzschia sp.</i>	45 - 47
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	20 - 30
<i>Schizochytrium sp.</i>	50 - 77
<i>Tetraselmis sueica</i>	15 - 23

Fonte:(CHISTI, 2007)

Na Tabela 3 observa-se uma comparação entre o teor de óleo (% em peso seco) da *Botryococcus braunii* e outras microalgas.

Botryococcus braunii é de água doce, mas que pode sobreviver em ambientes salobres, podese encontrada em vários lugares ao redor do mundo. A microalga em questão pode ser subdividida em quatro Raças (A, B, C e S), cada uma definida pela composição e estrutura de seus hidrocarbonetos produzidos. Raça A é conhecida por produzir alcadienos e alcatrienos, Raça B por triterpenos (mais comumente conhecidos como botriococenos), Raça L por licopadieno e Raça S epóxi-n-alcano e n-saturado cadeias de alcano com comprimentos respectivamente de, 18 e 20 (JACKSON; BAHRI; MOHEIMANI, 2017).

A temperatura ótima de crescimento observado por Singh, SP e Singh, P. (2015) foi de 25 – 30° C, sendo 5° C a menor temperatura tolerável e 35°C a maior. A figura 3 mostra características das colônias de *Botryococcus braunii*, que é uma alga verde colonial. A cepa produz hidrocarbonetos $C_{nH_{2n-10}}$ (n = 30–34) chamados botriococenos. Os botriococenos são sintetizados dentro das células da colônia e são observados como corpos oleosos

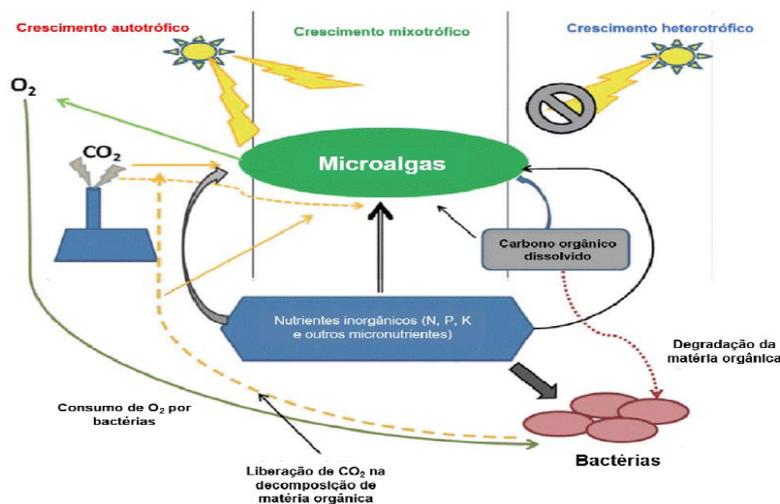
capazes de sintetizar suas moléculas orgânicas a partir de materiais inorgânicos (dióxido de carbono e sais) e energia solar, produzindo os compostos necessários sem necessitar de uma fonte de carbono orgânico. Mesmo que a cultura apresente eficiência com a incidência de luz sobre a ela, neste tipo de cultivo deve-se considerar alguns fatores que podem ocasionar uma redução do crescimento da mesma, a densidade celular é uma variável que deve ser analisada quando está em altas concentrações porque interferem na incidência da luz, limitando a sua passagem, ou em baixa densidade celular, promovendo o excesso de luz (conhecido como fotoinibição) (MORAIS, 2011).

Outro tipo de cultivo é o heterotrófico, na qual os nutrientes são disponibilizados para que o metabolismo ocorra na ausência da luz, se difere pelo fato das microalgas utilizarem compostos orgânicos (glicerol, glicose e acetato) como fonte de energia e carbono. Apresentando como maior vantagem o controle do processo de cultivo e o baixo custo na colheita de biomassa (MORAIS, 2011).

Por fim, o cultivo mixotrófico que atua o metabolismo autotrófico e heterotrófico citados anteriormente, fazendo com que microalga assimile de forma simultânea o dióxido de carbono e a fonte de carbono fornecida a ela (MORAIS, 2011).

Existem, ainda, variadas condições ou fatores que influenciam o crescimento das microalgas. Os fatores químicos, abióticos, físicos e bióticos e operacionais influenciam a taxa de crescimento das microalgas (quadro1). De acordo com Barsanti e Gualtieri (2006), os parâmetros mais importantes que regulam o crescimento de microalgas são: fotoperíodo e a intensidade luminosa, concentração de nutriente, temperatura, pH, salinidade e mistura.

Figura 4 - Esquema do metabolismo de microalgas.



Porém, é importante ressaltar o fato de os intervalos tolerados, assim como os parâmetros ideais, serem específicos para cada espécie e os fatores não precisam ser dependentes entre si, ou seja, um parâmetro ideal para um conjunto de condições não precisa ser necessariamente ideal para outro. Temos a luz como a fonte de energia capaz de impulsionar as reações fotossintéticas das microalgas, a qualidade espectral, a intensidade e o fotoperíodo são aspectos fundamentais. A intensidade da luz desempenha um papel de grande importância, no entanto varia muito com a densidade e profundidade da cultura. Microalgas de culturas muito densas e com partes decantadas em um reator, limitam a quantidade de absorção de luz que estes microrganismos conseguem absorver.

Quadro 1- Fatores que influenciam o crescimento das microalgas

Fatores	
Abióticos, físicos e químicos	Intensidade luminosa e fotoperíodo Temperatura Concentração de nutrientes, O ₂ e CO ₂ pH Salinidade Substâncias inibidoras
Bióticos	Patogênicos (bactérias, fungos, vírus) Predação pelo zooplâncton Competição entre espécies
Operacionais	Mistura Taxa de diluição Profundidade Adição de bicarbonato Frequência de colheita

Fonte: AZEREDO, 2012

A depender da microalga, pode-se ter o uso de apenas um tipo de metabolismo, ou podem alternar entre essas rotas metabólicas, mas tendem a exibir melhor crescimento em um dos modos, gerando metabólitos de forma mais eficiente. Além dos lipídeos, as microalgas possuem outros metabólitos de valor agregado, por exemplo, carboidratos, pigmentos e proteínas que podem ser comercializados e refinados com diferentes aplicações (AZEREDO, 2012)

Os carboidratos são os principais constituinte da célula algal, com maior importância. Esses compostos possuem alto valor agregado, com diversas aplicações nas indústrias

(indústrias alimentícias, fabricação de lubrificantes, cosméticos, têxteis, entre outras) (ARAD; LEVY-ONTMAN, 2010).

A classificação dos lipídeos acumulados pelas microalgas é de acordo com o número de carbono. Se os ácidos graxos formarem uma cadeia de 14-20 carbonos, então podem ser utilizados na produção do biodiesel, enquanto aqueles com cadeias maiores são usados como suplementos alimentares, como por exemplo, ácido docosaenoico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA) (YEN *et al.*, 2013).

3.5 FATORES QUE INFLUENCIAM O CRESCIMENTO CELULAR

No ambiente natural as microalgas estão expostas a uma variedade de condições ambientais. Estas condições ambientais sofrem variações de acordo com o ciclo sazonal (variação anual que está dependente da zona geográfica e climática) e o ciclo circadiano (variações de luz e temperatura num ciclo de 24h). A capacidade de adaptação é uma das mais importantes características destes organismos. Por vezes as reações de aclimação incluem mudanças nos fenômenos de degradação e formação dos fotosistemas, em resposta às alterações na intensidade e qualidade da luz. Estes fotosistemas são complexos proteicos (são enzimas) que utilizam da energia luminosa para reduzir as moléculas durante o acontecimento da fotossíntese (RICHMOND, 2004).

Para evitar o aumento de stress celular, estas mudanças permitem equilibrar a produção de adenosina trifosfato (ATP). As culturas de microalgas requerem o controlo rigoroso de todos os fatores de crescimento: pH, concentração de CO₂, O₂, nutrientes, temperatura e luz. É necessário compreender o comportamento dos microrganismos sob diferentes condições ambientais para melhor otimização do crescimento celular (RICHMOND, 2004).

3.5.1 pH

Uma grande parte das espécies de microalgas é favorecida por pH neutro, porém, alguns gêneros conseguem suportar valores até 4,0 e 9,0. O aumento do pH está em função da atividade fotossintética. O pH influencia na eficiência do fósforo e na de remoção de nitrogênio através da volatilização da amônia, além da precipitação de ortofosfato. O equilíbrio químico gera uma relação complexa entre a disponibilidade de dióxido de carbono

dissolvido no meio de cultivo e o pH, sendo diretamente relacionado a manutenção do pH e a produtividade de biomassa em cultivos autotróficos (KUMAR *et al.*, 2010).

3.5.2 NUTRIENTES (SUPLEMENTAÇÃO)

Podendo ser classificado como macronutrientes e micronutrientes, a concentração dos nutrientes é um fator químico, que tem grande interferência no crescimento das microalgas. Os macronutrientes são aqueles que são necessários em concentrações da ordem de centenas ou milhares de $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca. Os principais: Fe, Si, Mg, K, S, N, P, O, H e C. Os micronutrientes são aqueles que precisam estar em concentrações menores que os macronutrientes, mas ainda assim são de grande importância no metabolismo das microalgas. Alguns exemplos de micronutrientes: Cu, Mn, Mo, V, Ca, Co e Ni (LOURENÇO, 2006). Alguns nutrientes e suas funções nas células são listados no quadro 2. A inibição ou estímulo do crescimento da cultura dependem da quantidade de nutrientes presentes no meio (SHEEHAN *et al.*, 1998).

Existem elementos que podem causar limitação no crescimento da microalga, entre os principais estão: o carbono, o nitrogênio e o fósforo (LOURENÇO, 2006).

Entre os minerais essenciais, o ferro desempenha um papel de grande importância na composição bioquímica celular por causa de suas propriedades redox e implicação em processos fundamentais, como a respiração a fotossíntese, síntese de DNA e fixação de nitrogênio (RICHMOND, 2004).

A forma como os nutrientes são levados para o meio influencia na composição bioquímica das células cultivadas e no crescimento do cultivo. Isso ocorre por conta de alterações em condições químicas, como mudanças físicas ou a mudança de pH, como a redução da transparência do meio de cultivo. A fórmula química dos compostos que levam os elementos no meio de cultivo também pode causar alterações na concentração de compostos, como lipídeos, proteínas, pigmentos e carboidratos devido à seletividade de absorção das células, sendo o elemento que contém esses nutrientes aproveitado ou não pelas células cultivadas (PODEVIN *et al.*, 2015).

Como exemplo, Ruangsomboon (2015) encontrou no cultivo da microalga *Botryococcus braunii* diferentes concentrações de ácidos graxos como resultado da utilização de diferentes fontes de nitrogênio (KNO_3 , NaNO_3 , $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ e NH_4HCO_3).

Dessa forma, não apenas a presença de micronutriente ou macronutriente influencia no cultivo, mas também como este é apresentado.

Quadro 2 - Nutrientes e suas funções no metabolismo das microalgas.

Elementos	Funções
Nitrogênio	Compõe diversas substâncias celulares, como os aminoácidos e a clorofila.
Ferro	Grupos ativos e enzimas, participando do nitrato e nitrito redutase.
Fósforo	Composição estrutural e transferência de energia, presente no ATP, ácidos nucléicos e fosfolípídeos.
Magnésio	Presente na clorofila e outras enzimas, tem função enzimática e como co-fator no transporte de íons.
Manganês	Presente nas proteínas de tiacóides, participando da manutenção da estrutura da membrana do cloroplasto.
Tiamina (Vit.B1)	Coenzima. Atua nos processos de fermentação e respiração celular.
Cianocobalamina (Vit. B12)	Co-fator de enzimas que participam da síntese de metionina.

Fonte: adaptado LOURENÇO 2006

3.5.3 LUZ

Em quantidades baixas ou elevadas a luz pode ser um fator limitante para o crescimento de microalgas. A formação de um elevado número de elétrons energéticos pode ser causado por uma alta irradiância luminosa e esses elétrons podem não ser completamente utilizados no ciclo de Calvin e assim formar moléculas de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), causando danos à estrutura celular interna. Esse efeito causado por uma irradiância luminosa maior que a suportada pelos fotossistemas é chamado de fotoinibição e pode levar a uma redução no crescimento celular (CHOJNACKA; NOWORYTA, 2006).

Já a fotolimitação ocorre quando uma baixa irradiância luminosa chega aos fotossistemas de uma microalga, o crescimento passa a ser limitado pela baixa produção de elétrons energéticos. Um aumento na intensidade da luz sobre os cultivos nessas condições levará à uma melhora no crescimento do cultivo, até chegar em um limite, uma intensidade luminosa máxima, onde o processo de fotoinibição passa a ser observado (JANSSEN, 2016).

3.5.4 AERAÇÃO

A aeração nos cultivos também se torna um fator limitante, porque impede que as células sedimentem, mantendo-as em suspensão no cultivo. Além de manter o sistema homogêneo do início ao fim do cultivo e todas as células são expostas as mesmas condições de cultivo. Essa aeração pode ser realizada por um sistema de bombas, sistema de agitação

mecânico (pás) em sistemas abertos, distribuição de bolhas pelo reator fechado e reciclo.

A aeração ajuda também no processo de respiração microbiana, deixando o meio homogêneo facilitando a dissociação do O₂ no cultivo e a troca de gases do microrganismo com o meio. (BORZANI, 2001).

3.5.5 TEMPERATURA

Trata-se de um parâmetro crítico, pois influencia os processos celulares afetando o crescimento, a capacidade fotossintética e respiração das microalgas. Em geral a temperatura ideal para as culturas de microalgas situa-se entre 25 a 35 °C, embora a literatura apresenta variações de acordo com a composição do meio de cultura, a espécie ou cepa cultivada. Temperaturas superiores a 35 °C são letais para algumas espécies, enquanto que abaixo de 16 °C desaceleram o crescimento. O efeito da temperatura sobre as reações bioquímicas torna este um dos mais importantes fatores ambientais que influenciam a composição bioquímica das algas. Outro fator importante sobre a temperatura é que sua diminuição pode resultar no aumento da produção de enzimas como um mecanismo adaptativo para a manutenção de taxas de fotossíntese e respiração (RICHMOND, 2004).

3.6 FONTES ALTERNATIVAS DE CARBONO ORGÂNICO

Diversas fontes alternativas de carbono têm sido testadas com o objetivo de gerar cultivos mixotróficos e heterotróficos mais baratos. Dentre as fontes que foram testadas, temos o melão de cana-de-açúcar e a beterraba, efluentes agrícolas e industriais e ureia (LOWREY; BROOKS; MCGINN, 2015). JI *et al.*, (2015) tiveram sucesso no cultivo mixotrófico da microalga *Scenedesmus obliquus* em meio composto por efluente de indústria de alimentos e efluente doméstico. Os efluentes agrícolas mesmo com um elevado nível de carbono em sua composição podem se apresentados de forma que não seja tóxica para o meio (BARROS *et al.*, 2017).

3.6.1 MELAÇO

O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto do refinamento do açúcar. A cana passa por um processo de prensa, na qual o suco separado do resíduo sólido (o bagaço). Para chegar no produto melaço, o suco é clarificado e concentrado por evaporação até a cristalização da sucrose, esses cristais são então extraídos por centrifugação onde é gerado o melaço, um líquido viscoso e escuro (BASSO *et al.*, 2011).

O melaço possui diversos minerais em sua composição, sendo os principais apresentados na Tabela 4. É rico em sucrose, com uma composição de 45% a 60% desse açúcar. Além disso, também possui de 5% a 20% de glucose e frutose. Sendo o melaço um subproduto do processo de refinamento da cana, esse composto é bastante disponível e acessível economicamente no país. A alta quantidade de açúcar presente em sua composição e a sua grande disponibilidade no mercado torna o melaço de cana-de-açúcar uma potencial fonte de carbono orgânico a ser utilizada em cultivos de larga escala (BASSO *et al.*, 2011).

Tabela 4 - Composição do melaço de cana-de-açúcar

Nutriente	Concentração (mg/L)
Nitrogênio (NH ₄ ⁺ e R- NH ₂)	70 – 350
Fósforo	20 – 200
Potássio	300 – 12000
Magnésio	80 – 3900
Enxofre	80 – 3900
Cálcio	150 – 2000
Zinco	0,45 – 9
Cobre	0,20 – 8
Manganês	2 – 8
Alumínio	2 – 500

Fonte: BASSO *et al.* (2011).

3.6.2 CHORUME

Visando a avaliação da influência dos teores de nutrientes no meio de cultivo e a sua relação com o teor de lipídios, o potencial das águas residuais como fonte de nutrientes para o cultivo de microalgas, vem sendo estudado (SUTHAR; VERMA, 2018). Dentre os tipos de efluentes que podem ser utilizados como nutriente tem-se o chorume, e este é originado devido à degradação de resíduos e lixiviação de água no aterro, com a precipitação (KAMARUDDIN *et al.*, 2015). A composição do chorume é variável e depende de fatores como a variação sazonal do tempo, a composição dos resíduos, precipitação, e a idade do

aterro. E se tratando da composição, a amônia é um contaminante predominante no chorume, que quando descartado de modo errôneo, pode acarretar grave poluição ao meio ambiente .

As microalgas são capazes de realizar a exclusão de substâncias indesejáveis do chorume, o que possibilita a reciclagem de nutrientes como nitrogênio e fósforo, e a biomassa resultante pode ainda ser utilizada para a produção de biocompostos (HERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2019).

3.7 TECNOLOGIAS DE CULTIVO

O cultivo das microalgas pode ser classificado pela via metabólica mas também pela tecnologia usada. Podemos encontrar culturas suspensas e imobilizadas. Para as culturas suspensas, temos a existência de sistemas abertos, sistemas fechados e sistemas híbrido. Em culturas imobilizadas as microalgas são fixadas em um meio sólido, mas a troca de produtos e substratos é possível pelos poros do material, o qual pode ser natural (ex.: agar) ou sintético (ex.: poliuterano) (CAI *et al.*, 2013).

Os sistemas abertos em geral dependem de fatores externos, têm contato direto com o ar livre e são mais simples de operar e construir, sendo o mais usado por razões econômicas. (CHISTI, 2007).

O crescimento em sistemas fechados apresentam alto custo de manutenção e de investimento, mas apresentam diversas vantagens, uma vez que as condições de crescimento da cultura podem ser controladas, as possíveis contaminações e a evaporação da água podem ser evitadas, além de poder atingir concentrações elevadas de biomassa (CAI *et al.*, 2013).

Por fim, o modo de produção híbrido que é a junção dos anteriores, combinando as capacidades do sistema aberto e do sistema fechado num sistema de cultivo em dois estágios. O primeiro estágio caracteriza-se por um cultivo em fotobiorreatores fechados de forma a produzir o inóculo para o segundo estágio, no qual as microalgas são cultivadas em lagoas abertas. Assim, as culturas são expostas à mínima contaminação possível antes de serem alimentadas em lagoas de grande escala. Contudo, o custo do primeiro estágio limita a aplicação em grande escala deste sistema (CAI *et al.*, 2013).

3.8 BIORREFINARIAS

Um dos maiores obstáculos no uso de microalgas para produção de biodiesel e outros biocompostos está no alto custo que as tecnologias envolvidas possuem. Uma alternativa para o problema em questão seria a produção de biomassas de microalgas para uso em biorrefinaria. Visto que o aproveitamento de toda a biomassa para produção de produtos de alto valor agregado pode ser maior (NUNE, 2013).

A biorrefinaria é um complexo integrado que produz uma série de produtos a partir de uma variedade de matérias-primas, na qual o conceito é semelhante ao de refinaria de petróleo tradicional, tendo como a principal diferença as matérias-primas (biomassa / petróleo bruto) e as tecnologias empregadas (VENKATA. *et al.*, 2016). O quadro 3 mostra um resumo das diferenças entre as biorrefinarias e refinarias.

Quadro 3 - Resumo das diferenças entre biorrefinarias e refinarias.

Refinaria	Biorrefinaria
Matéria-prima relativamente homogênea	Matéria-prima heterogênea
Maior parte de processos físico-químicos	Combinação de processos de natureza distinta (termoquímico, químicos, bioquímico,...)
Geração de muitos intermediários em escala comercial	Geração de poucos intermediários em escala comercial
Processamento primário da matéria-prima gera produtos diferenciados	Processamento primário da matéria-prima gera produtos intermediários que podem ser destinados para produção de um mesmo produto ou produtos distintos

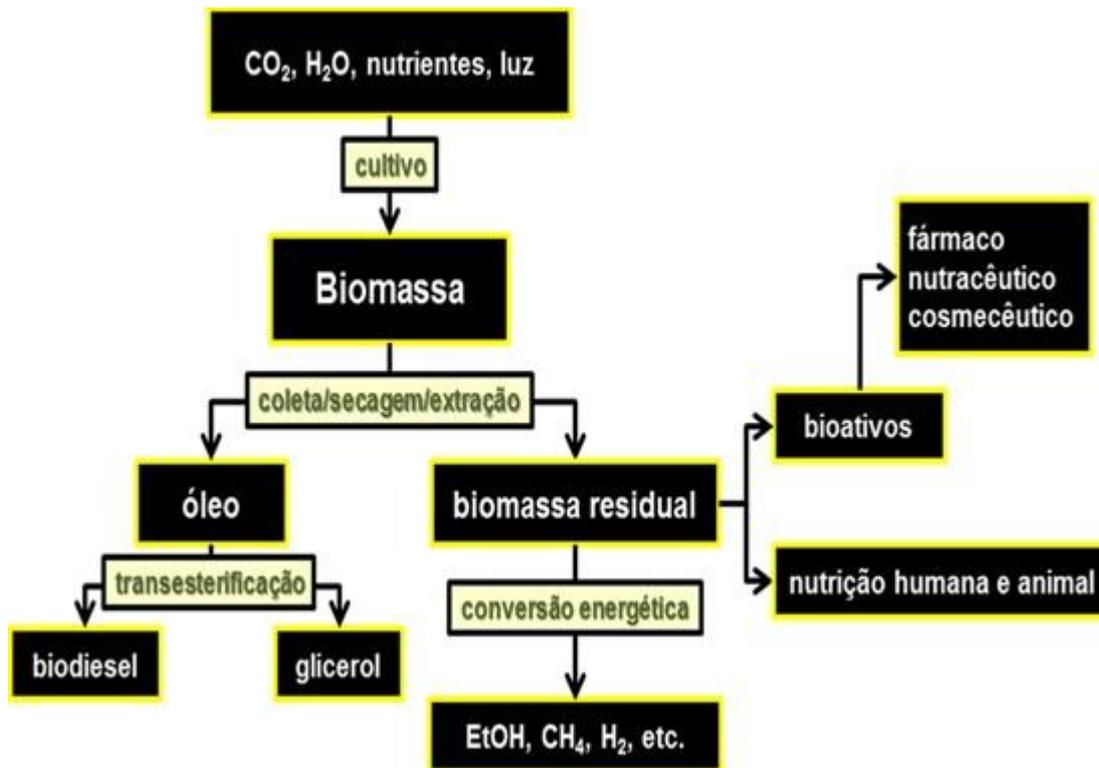
Fonte: VENKATA *et al.*, 2016.

Para uma definição mais ampla, as biorrefinarias utilizam um grande e diversificada gama de biomassa: todos os resíduos orgânicos, cultural energético e biomassa aquática, para obter numerosos produtos dentre eles: combustíveis, produtos químicos, energia, calor, materiais e alimentos para animais (PÉREZ *et al.*, 2017).

As biorrefinarias são encontradas em diversos setores em escala industrial, e isso permite que elas se concentrem no processamento de vários produtos o que torna crucialo desenvolvimento de novas tecnologias que levem ao aproveitamento de todo o potencial econômico e energético das biomassas, devendo ser considerada, ainda, a sustentabilidade das cadeias produtivas (SARAL; AJMAL; RANGANATHAN, 2022).

O importante papel das microalgas na produção de biocombustíveis e produtos químicos de base biológica torna-as promissoras como uma alternativa a muitos componentes e fontes naturais e não naturais. Um fluxograma é mostrado na figura 5, onde mostra a eficiência que uma biorrefinaria pode trazer ao utilizar a biomassa de microalgas.

FIGURA 5 - Fluxograma de uma biorrefinaria de microalgas.



Fonte:(NUNE, 2013)

3.9 MÉTODO DE TAGUCHI

O método de Taguchi é uma técnica de planejamento experimental desenvolvida pelo engenheiro japonês Genichi Taguchi feito com o objetivo de projetar produtos ou processos que seriam: pouco sensíveis a variações ambientais; pouco sensíveis a variações nos componentes e tivessem variação mínima em torno do valor alvo (BRUNS; BARROS NETO; SCARMINIO, 2001).

Taguchi desenvolveu então uma abordagem que consiste em um projeto fatorial fracionado frequentemente utilizado em projetos de desenvolvimento robusto de produtos

e processos. Como mencionado por Amaral *et al.* (2020) e Bobde (2019), o método em questão tem sido amplamente utilizado no planejamento experimental de muitas pesquisas envolvendo o cultivo de microalgas e desagregação celular para extração de biocompostos.

Comparado aos demais métodos estatísticos, o método de Taguchi consegue apresentar a melhor condição de ajuste dos fatores, evidenciando ainda, quais deles possuem o maior efeito sobre o sistema e o quanto significativo são para o processo. A metodologia de Taguchi pode ser utilizada não apenas na etapa inicial de cultivo das microalgas, mas também nas etapas de extração do óleo e posterior transesterificação (AMARAL, 2018; REIS *et al.*, 2016; MAHAMUNI; ADEWUYI, 2010).

No presente trabalho, o método será utilizado na etapa inicial de cultivo para obter as melhores combinações das variáveis, visando maior produtividade em biomassa e maior teor de lipídeos.

3.9.1 FUNCIONAMENTO DO MÉTODO DE TAGUCHI

O método de Taguchi é uma abordagem que mescla técnicas estatísticas e de engenharia que faz uso de operações matriciais, utilizando arranjos ortogonais em que as colunas para as variáveis independentes são ortogonais umas às outras. As matrizes são organizadas para garantir que todos os fatores de todos os níveis sejam considerados igualmente e os fatores avaliados de forma independente. A metodologia Taguchi utiliza diversas matrizes de projeto, como L4, L8, L9, L12, L16, L18, L27 e L64 (o numeral indica a quantidade de experimentos a serem realizados), que focam nos principais efeitos e aumentam a eficiência e a reprodutibilidade de experimentos em pequena escala (GÜNDÖLDÜ *et al.*, 2014).

A análise dos dados experimentais é feita através da ANOVA, que para alcançar as respostas desejadas fornece informações sobre os fatores estatisticamente significativos e seus níveis ideais. Através da ANOVA podemos verificar a significância (teste F) entre dois ou mais fatores e encontrar quais são relevantes e significantes. Com isso, podemos estudar um grande número de variáveis mesmo com um pequeno número de experimentos obtendo excelentes resultados e diminuindo os custos (pois poucos experimentos serão realizados) (USTAOGLU *et al.*, 2022).

O método de Taguchi leva em conta os fatores externos que não podem ser controlados, os chamados ruídos, que são interferências que influenciam sobre a variabilidade dos experimentos. A razão sinal-ruído (S/N), razão entre a potência de um sinal

e a potência do ruído sobreposto a este sinal, é utilizada para investigar a variação da resposta, que influencia na redução da variação da característica da qualidade. A relação (S/N) compara o nível de um sinal desejado com o nível do ruído e quanto mais alta for a relação sinal-ruído, menor é o efeito do ruído sobre a detecção ou medição do sinal (BOSE *et al.*, 2022; VAIDYA *et al.*, 2022).

Com base na relação sinal-ruído (S/N), Taguchi classificou as características de desempenho em três categorias (YANG; HWANG; LEE, 2002):

- Característica S/N menor é melhor

$$\frac{S}{N} = 10 \log \left(\frac{\sum_{i=0}^n Y_i^2}{n} \right) \quad (1)$$

Onde n é o número de respostas observadas para cada condição experimental, e Y_i o valor da resposta na dada condição experimental, sendo i um valor inteiro e positivo.

- Característica S/N maior é melhor

$$\frac{S}{N} = 10 \log \left(\sum_{i=1}^n \left(\frac{1}{n} \right) \left(\frac{1}{Y_i^2} \right) \right) \quad (2)$$

Onde n é o número de respostas observadas para cada condição experimental, e Y_i o valor da resposta na dada condição experimental, sendo i um valor inteiro e positivo.

- Característica S/N nominal é melhor

$$\frac{S}{N} = 10 \log \left(\frac{\bar{Y}^2}{S^2} \right) \quad (3)$$

$$\bar{Y} = \frac{Y_i}{n} \quad (3.1)$$

$$S = \frac{1}{n-1} \sum (Y_i - \bar{y})^2 \quad (3.2)$$

Diante da necessidade de opção para obtenção de biocompostos com diferentes aplicações, e de forma a não poluir o meio ambiente, neste trabalho propõe-se estudar fatores que podem influenciar no processo de obtenção de biomassa microalgal.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Engenharia de Microalgas (LEM) pertencente ao Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia Lorena da Universidade de São Paulo.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 MICROALGA *BOTRYOCOCCUS BRAUNII*

Todos os experimentos foram realizados com a linhagem do *Botryococcus braunii* que faz parte da coleção de microalgas e cianobactérias do LEM.

4.1.2 REAGENTES

Os reagentes utilizados na execução dos experimentos e na preparação dos meios de cultura foram de grau padrão analítico para microbiologia, que permitem menor variabilidade e maior precisão no meio de cultivo.

A Tabela 5 apresenta os reagentes usados para a preparação do meio WC (ANDERSEN, 2015) utilizados nos inóculos, manutenção das células e cultivos do *Botryococcus Braunii*.

Na floculação foi utilizada uma solução de Sulfato de Alumínio 3 mg/L (PRAGYA; PANDEY; SAHOO, 2013). Para as extrações dos lipídios da biomassa microalgal foram utilizados metanol e clorofórmio grau analítico e água destilada (BLIGH; DYER, 1959; CHATSUNGNOEN; CHISTI, 2016).

Tabela 5- Composição meio WC.

Composição MeioWC
<u>0,1 mL/L</u>
NaNO ₃
H ₂ HPO ₄
MgSO ₄ .7H ₂ O
CaCl ₂ .2H ₂ O
NaHCO ₃
Solução de metais
<u>+ Vitaminas B₂, B₁₂</u>

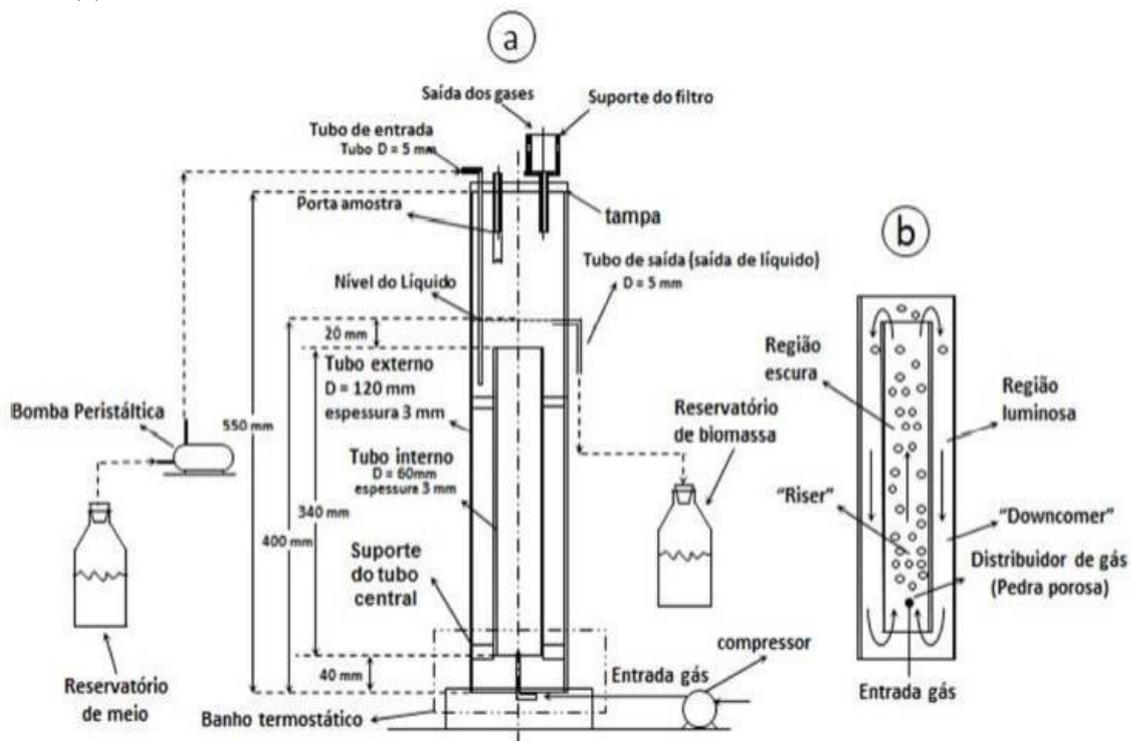
Fonte: ANDERSEN (2015).

4.2 EQUIPAMENTOS

4.2.1 FOTOBIORREATOR AIRLIFT

O presente trabalho analisou o crescimento da microalga apenas em escala laboratorial, em Airlifts com um volume de trabalho de 3,8L, com iluminação por 24 horas com lâmpadas LED de 18 W potência e com filtros para aeração (Aquarium Air Pump da Xilong) de 5 W de potência por 24 horas, as figuras 6 e 7 apresentam, respectivamente, desenho esquemático e foto dos fotobiorreatores utilizados.

Figura 6 - Diagrama esquemático do sistema de cultivo utilizado para o crescimento da microalga *C. minutissima* 26a. Fotobiorreator airlift com Tubos concêntricos (a), detalhes do sistema airlift interno (b).



Fonte: TAGLIAFERRO (2017).

Figura 7 - Fotobiorreatores utilizados no cultivo, operando no laboratório de engenharia de microalgas (DEQUI - USP).



Fonte: Autora .

4.2.2 OUTROS EQUIPAMENTOS

Outros equipamentos utilizados foram: balança analítica (Modelo DC-1210D, Fabricante YMC), espectrofotômetro UV-Vis da Bel Photonics, ultrassom (Modelo Q3.0/40A, Fabricante: Ultronique), microscópio ótico (Opton), câmara de Neubauer (New Optics), estufa (Modelo MA 033, Fabricante: Marconi) e bomba de vácuo (Modelo: 141, Tipo: 2VC, Número DG009, Fabricante: PRIMAR).

4.3 PROCEDIMENTOS

4.3.1 PREPARAÇÃO DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

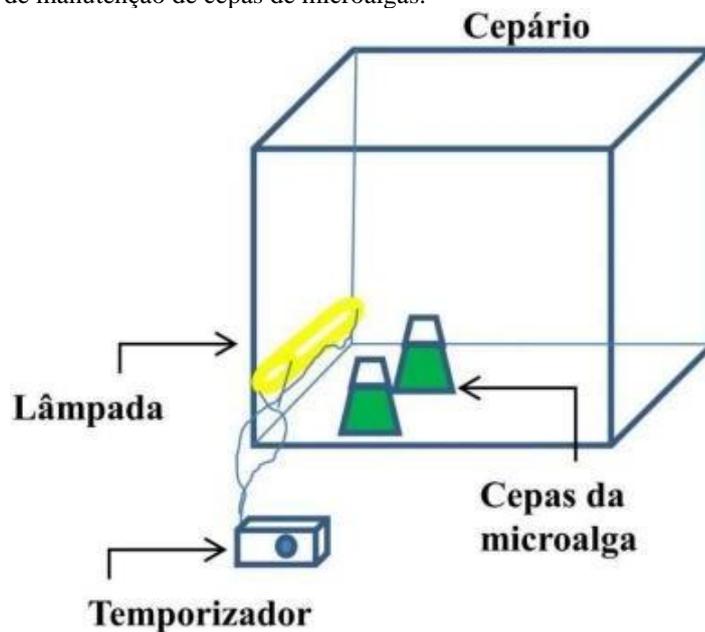
Para a realização dos meios e cultivos, todos os biorreatores foram lavados com hipoclorito de sódio, detergente, água corrente e álcool etílico em solução 70% v/v para desinfecção dos mesmos.

Todos os demais materiais utilizados foram lavados com detergente e água corrente, relavados com água destilada e álcool etílico em solução 70% v/v.

4.3.2 INÓCULOS E REPICAGEM

Os inóculos da microalga *B. Braunii* foram previamente cultivados em um cepário conforme a figura 8, iluminado por lâmpada fluorescente com potência de 15W por 24 horas por dia, mantidas em meio artificial WC.

Figura 8 - Estrutura de manutenção de cepas de microalgas.

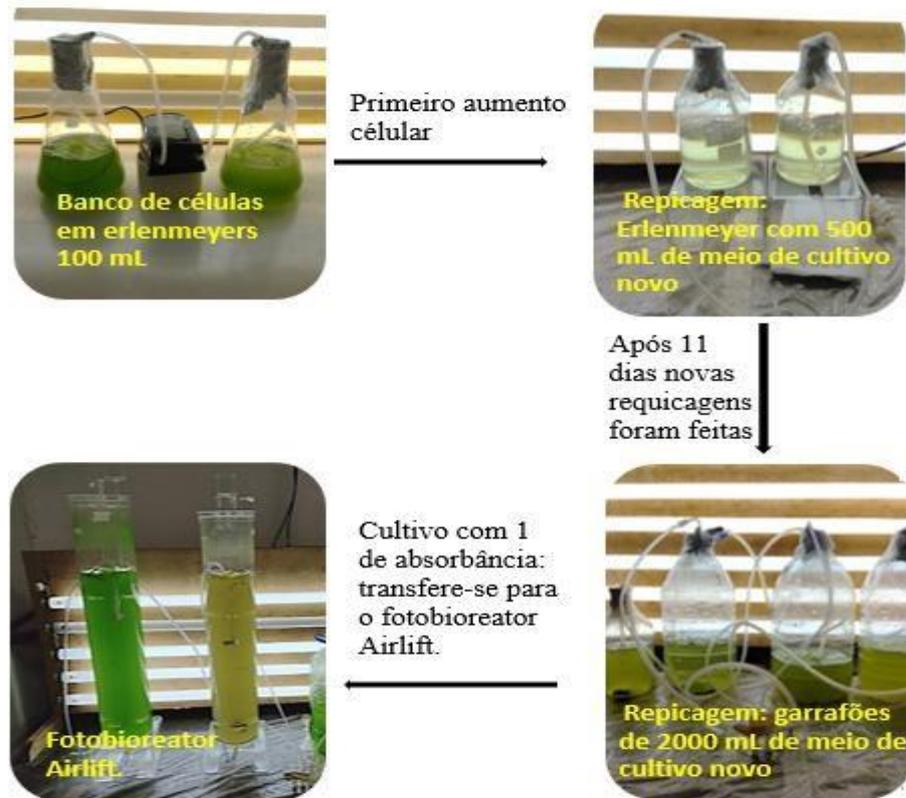


Fonte: AMARAL (2014).

As cepas passaram por um processo denominado repicagem, onde ocorreu um aumento tanto em número de células como em volume, executado sob condições controladas para garantir a qualidade dos microrganismos para o cultivo em maior escala.

As repicagens aconteceram da seguinte forma: partindo de um banco de células em um erlenmeyer contendo 100 mL de cepas para um outro erlenmeyer contendo 500 mL de meio de cultivo novo, meio WC, após o crescimento da *Braunii*, cerca de 11 dias de cultivo, foi feita uma nova repicagem para 2000 mL de meio novo. Em seguida foram feitas repicagens contínuas e quando o cultivo chegava em uma absorvância igual a 1 era transferido para um fotobiorreator Airlift variando-se as condições experimentais pelo método experimental de Taguchi. Um esquema das repicagens é mostrado na figura 9.

Figura 9 - Esquema do aumento celular- Repicagens.



Fonte: Autora.

Todos cultivos foram mantidos em uma sala refrigerada a 20°C com iluminação e aeração por 24 horas.

4.3.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Os ensaios com os cultivos nos fotobiorreatores (3,8 de volume útil) foram realizados variando quantidades de: chorume, nitrato de sódio, bicarbonato de sódio, meloço e acetato de sódio de acordo com a Tabela 6 e a 7. Tendo como propósito determinar a melhor condição de cultivo do *B. Braunii* para maior produtividade volumétrica em biomassa ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) e produtividade lipídica ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$).

Tabela 6 - Fatores considerados no planejamento de experimentos e seus respectivos níveis.

Variáveis		Níveis		
		1	1.50	2
Concentração chorume(%)	(A)	0	0.5	1
Nitrato de sódio	(B)	0	0.5 g/L	1 g/L
Bicarbonato de sódio	(C)	0	1 g/L	2 g/L
Melaço	(D)	0	0.1 g/L	0.2 g/L
Acetato de sódio	(E)	0	1 g/L	2 g/L

Fonte: Autora.

Os cultivos foram estudados pelo planejamento experimental L8 de Taguchi incluindo o ponto central (Tabela 7) e se deram no regime em batelada.

Tabela 7- Matriz experimental L8 de Taguchi.

Experimento	Fatores				
	A	B	C	D	E
1	1	1	1	1	1
2	1	1	2	2	2
3	1	2	1	1	2
4	1	2	2	2	1
5	2	1	1	2	2
6	2	1	2	1	1
7	2	2	1	2	1
8	2	2	2	1	2
9	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50

Fonte: Autora.

4.3.4 ACOMPANHAMENTO DOS CULTIVOS

O crescimento do cultivo foi controlado por meio da contagem de células em um microscópio da OPTON com o auxílio de um hemacitômetro, tipo câmera de Neubauer de 0,1mm de profundidade e por leituras de absorbâncias em espectrofotômetro UV-Visda Bel Photonics (a 680 nm).

Utilizando-se um pequeno béquer, cerca de 10 mL de meio de cultivo foram coletados diariamente e transferido para uma cubeta de quartzo onde efetuou-se a leitura da absorbância, em seguida a mesma alíquota foi utilizada para a contagem de células no microscópio. Quando os valores ficaram constantes, um período de 10 - 12 dias, o cultivo foi parado e feito a análise da biomassa.

Foi feita a medição do pH no início e fim dos cultivos nos fotobiorreatores, usando um medidor de pH de tiras de papel.

4.3.5 COLHEITA, FLOCULAÇÃO E FILTRAÇÃO DA BIOMASSA

A colheita da biomassa iniciou-se com a floculação do cultivo utilizando-se, como agente floculante o Sulfato de Alumínio 3mL/L, em um béquer de 4L, figura 10.

Figura 10 - Béquer com biomassa floculada.



Fonte: Autora .

Após a floculação, procedeu-se a retirada do excesso de água e em seguida, a biomassa foi filtrada sob vácuo, utilizando um sistema montado com kitassato e funil de porcelana Büchner com papel de filtro. A figura 11 mostra o sistema de filtração.

Figura 11 - Sistema para filtração da biomassa.



Fonte: Autora .

4.3.6 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA (SECAGEM E TRITURAÇÃO)

A biomassa foi então disposta em vidro de relógio previamente tarado e levado para a estufa a 65°C por 24 horas. Após a secagem, a biomassa foi colocada em dessecador para estabilizar em temperatura ambiente e posteriormente devidamente pesada. Calculou-se por diferença de peso (antes e depois da secagem) a quantidade de biomassa seca presente em cada experimento.

Em seguida, a biomassa foi triturada utilizando gral de porcelana e pistilo, até atingir a consistência de um pó fino e homogêneo, isento de grumos ou pedaços.

4.3.7 CÁLCULO DA PRODUTIVIDADE EM BIOMASSA

A produtividade em biomassa (P_x) foi determinada conforme a equação 4, descrita em (ANDERSEN, 2004).

$$P_x = \frac{X_f - X_i}{T_f - T_i} \quad (4)$$

Onde: P_x = produtividade em biomassa (mg/ L.dia) ou em células (cél/ mL.dia) ; X_i =biomassa inicial (mg/L) ou densidade celular inicial (cél/ mL); ; X_f = biomassa final (mg/L

) ou densidade celular inicial (cél/ mL); T_f = tempo final (dias); T_i = tempo inicial (dias).

4.3.8 RENDIMENTO MÁXIMO DA CULTURA (R)

Corresponde à densidade celular, células.mL⁻¹, obtida no final de cada experimento subtraída da densidade celular inicial do cultivo (inóculo), células.mL⁻¹.

4.3.9 EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS

Conforme descrito por Zorn *et al.* (2017) a extração de lipídeos se deu pelo seguinte procedimento:

- Pesou-se 1g da biomassa seca em erlenmeyers de 125 ml;
- Adicionou-se 1,78 ml de água para fixar a umidade e cobriu-se a boca dos erlenmeyers com plástico filme;
- Levou-se o erlenmeyers ao ultrassom durante 15 minutos, figura 12;
- Após os primeiros 15 min, adicionou-se 9,4ml de clorofórmio e homogeneizou-se a solução;
- Adicionou-se 10,2ml de metanol e homogeneizou-se;
- Aplicou-se no ultrassom novamente por mais 35 minutos;
- Adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio;
- Aplicou-se o ultrassom novamente por mais 35 min;
- Adicionou-se 3,4ml de água para ocorrer a separação de fases;
- Filtrou-se a solução em um funil como mostra a figura 13 e recolheu-se a fase apolar (escura) em um vidro de amostra (figura 14) e levou à estufa até ocorrer toda secagem.

Figura 12 - Esquema de Erlenmeyers em ultrassom.



Fonte: Autora .

Figura 13 - Filtração da biomassa e separação de fases.



Fonte: Autora.

Figura 14 - Separação de fases e recolhimento em vidro amostra da parte apolar.



Fonte: Autora .

4.3.10 CÁLCULO DO TEOR DE LIPÍDIOS

O percentual de lipídios extraídos da biomassa foi determinado conforme a equação 5.

$$\% \text{ Lipídios} = \left(\frac{\text{Massa final de lipídios(g)}}{\text{Massa inicial de Biomassa (g)}} \right) \times 100 \quad (5)$$

A produtividade em lipídeos foi determinada pelo produto da produtividade em biomassa pela fração mássica do lipídeo (GRIFFITHS; HARRISON, 2009).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

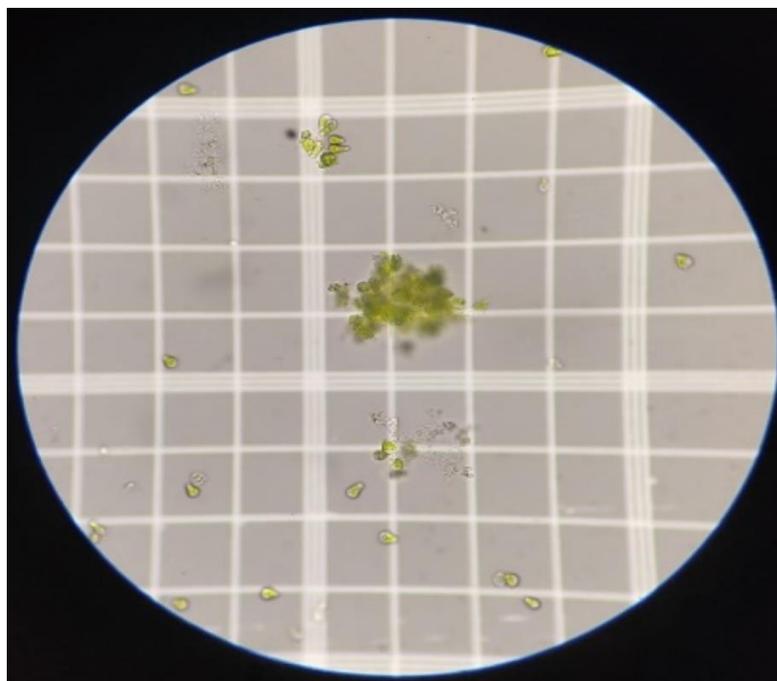
Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados dos primeiros experimentos com ênfase na biomassa e lipídeos produzidos.

5.1 CRESCIMENTO DA *BOTRYOCOCCUS BRAUNII* NO FOTOBIORREATOR AIRLIFT

Os cultivos no fotobiorreator airlift só foram iniciados quando os repiques da *Botryococcus braunii* estavam com ABS igual a 1, como explicado no item 4.3.2, essa padronização foi escolhida pois os repiques se mostravam mais saudáveis e resistentes a variações ambientais e a contaminações.

Durante todo o crescimento da microalga foram retiradas alíquotas diárias do cultivo para contagem de células, devido a característica da *Botryococcus braunii* em formar colônias, em alguns momentos essa contagem se tornou difícil, podemos observar na figura 15.

Figura 15 - Formação de colônias da *Botryococcus braunii*



Fonte: Autora .

No experimento 8, Tabela 8, pode-se observar o maior rendimento em termos de

cultura com $6,050 \times 10^6$ células mL^{-1} chegando em uma densidade celular final de $6,100 \times 10^6$ células mL^{-1} e os experimentos 2 e 4 foram os que tiveram menor rendimento de cultura, 3.300×10^6 células mL^{-1} , com uma densidade celular final de $3,350 \times 10^6$ células mL^{-1} .

O valor de pH não foi uma das variáveis de controle, mas foi feita a sua medição no início e fim dos cultivos, nos fotobiorreatores, para ter um breve entendimento do seu comportamento e influência. Na Tabela 9 pode ser observado que a variação máxima em um mesmo cultivo foi de 2, sendo o $\text{pH}=9$ e $\text{pH}=10$ os valores predominantes.

Tabela 8 – Rendimento máximo da altura.

Experimento	Densidade celular		Rendimento máximo da cultura (R) Células/mL
	Inicial (inóculo) Células/mL	Final Células/mL	
1	5.0E+04	5.250E+06	5.2000E+06
2	5.0E+04	3.350E+06	3.3000E+06
3	5.0E+04	3.390E+06	3.3400E+06
4	5.0E+04	3.350E+06	3.3000E+06
5	5.0E+04	4.900E+06	4.8500E+06
6	5.0E+04	4.850E+06	4.8000E+06
7	5.0E+04	4.100E+06	4.0500E+06
8	5.0E+04	6.100E+06	6.0500E+06
9	5.0E+04	3.980E+06	3.9300E+06

Fonte: Autora.

Tabela 9 – Variação do pH durante o cultivo no fotobiorreator.

Experimento	pH		
	Início do cultivo	Final do cultivo	Variação
1	8	10	2
2	9	9	0
3	9	10	1
4	8	10	2
5	9	9	0
6	10	10	0
7	9	9	0
8	8	10	2
9	9	10	1

Fonte: Autor .

Analisando o rendimento máximo da cultura e a variação do pH não foi encontrada nenhuma relação significativa, uma curva linear foi gerada com $R^2=0,0668$, podemos concluir que a variação do pH não tem influência direta no crescimento da microalga *B. Braunii*, o que está de acordo com estudos realizados por Ge *et al.* (2011) e Dayananda *et al.* (2007b), que descreveram que o valor de pH, controlando na faixa de 6,0-8,5, não levou a efeitos significativos sobre o crescimento da microalga.

5.2 CONCENTRAÇÃO DA BIOMASSA MICROALGAL

Na Tabela 10 tem-se o resultado das médias das duplicata em relação a biomassa de cada experimento.

Pode-se observar que o experimento 6 foi o que teve maior concentração de biomassa seca com $0,793 \text{ g.L}^{-1}$.

Ferreira *et al.* (2021) realizaram um estudo com a *B. Braunii* usando o meio BG-11 em Erlenmeyer de 250 mL com o pH ajustado em 7 alcançaram uma biomassa final de $1,26 \text{ g.L}^{-1}$, Ramaraj *et al.* (2016) encontrou em seu estudo com a *Braunii* uma concentração de $8,57 \text{ g.L}^{-1}$, usando reatores de tanque agitado (CSTR) em regime contínuo com $\text{pH}=7,8$. Mostrando um resultado bem interessante ao se usar reatores CSTRs.

Tabela 10 - Concentração (mg.L^{-1}) de biomassa microalgal

Experimento	Concentração mg.L^{-1}
1	619,88
2	731,47
3	685,61
4	451,91
5	712,80
6	792,99
7	594,13
8	714,45
9	725,93

Fonte: Autora.

Bittencourt *et al.* (2010) realizaram uma pesquisa usando o meio padrão (3N- MBM) em processo descontínuo em fotobiorreator convencional para crescimento de *B. Braunii* e obtiveram uma concentração de biomassa final de $3,11 \text{ g.L}^{-1}$.

A utilização de diferentes nutrientes, respeitadas as diferenças de configuração dos fotobiorreatores e condições ambientais, podem ter sido as responsáveis pelos valores finais de biomassas mais baixos no presente trabalho.

5.3 TEOR LIPÍDICO

A Tabela 11 mostra o resultado das médias das duplicata em relação ao teor lipídico de cada experimento.

A espécie estudada pode variar o teor lipídico de 25,0 a 75,0% do peso seco da biomassa, de acordo com Chisti (2007), esta diferença pode ocorrer devido à variações ambientais, condições de cultivo – como deficiência de nitrogênio ou estresse salino.

Como observado na Tabela 9, o experimento 2 apresentou o mais alto teor lipídico no presente trabalho, com valor de 60,88% seguido dos experimentos: 7 com 42,33% de teor de lipídeos, do 8 com 35,76% e do 5 com 27,9%. No qual apresentaram um valor bem positivo quando comparados as literaturas.

O mesmo estudo mencionado anteriormente de Ferreira *et al.* (2021), obtiveram um teor lipídico de 30.2%.

Ramaraj *et al.* (2016), também mencionado anteriormente, foi encontrado um teor de 47,59% de lipídeos.

A pesquisa de Bittencourt *et al.* (2010), discutida na seção anterior, apresentou um teor de 33±2% de lipídios.

No estudo realizado por Ranga *et al.* (2007), que trabalharam com meio Chu 13, foi observado um conteúdo de lipídio total na faixa de 24-28% da microalga cultivada em diferentes meios de cultura com o intuito de indicar a importância da salinidade na composição da mesma, o controle apresentou uma menor porcentagem de lipídio (20%).

Tabela 11- Teor lipídico (%) presente na biomassa microalgal.

Experimento	Teor Lipídico (%)
1	15,17
2	60,885
3	24,92
4	24,675

Continua

Conclusão	
5	27,9
6	22
7	42,335
8	35,76
9	16,52

Fonte: Autor.

5.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Essa seção tem o objetivo de determinar as influências dos fatores estudados no presente trabalho (concentrações diferentes de chorume, nitrato de sódio, bicarbonato de sódio, acetato de sódio e melão) na produtividade de biomassa e de lipídeos da microalga *Botryococcus braunii*. Foi proposto o planejamento experimental de arranjo ortogonal de Taguchi (L_8 , mais o ponto central), definindo como variáveis independentes os fatores acima expostos em dois níveis (o terceiro nível foi necessário apenas para o ponto central).

5.4.1 PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA EM BIOMASSA (MG.L⁻¹.D⁻¹)

Os resultados da produtividade em biomassa encontram-se na Tabela 12.

Tabela 12 - Resposta para determinação da Produtividade volumétrica em biomassa (mg.L⁻¹.d⁻¹).

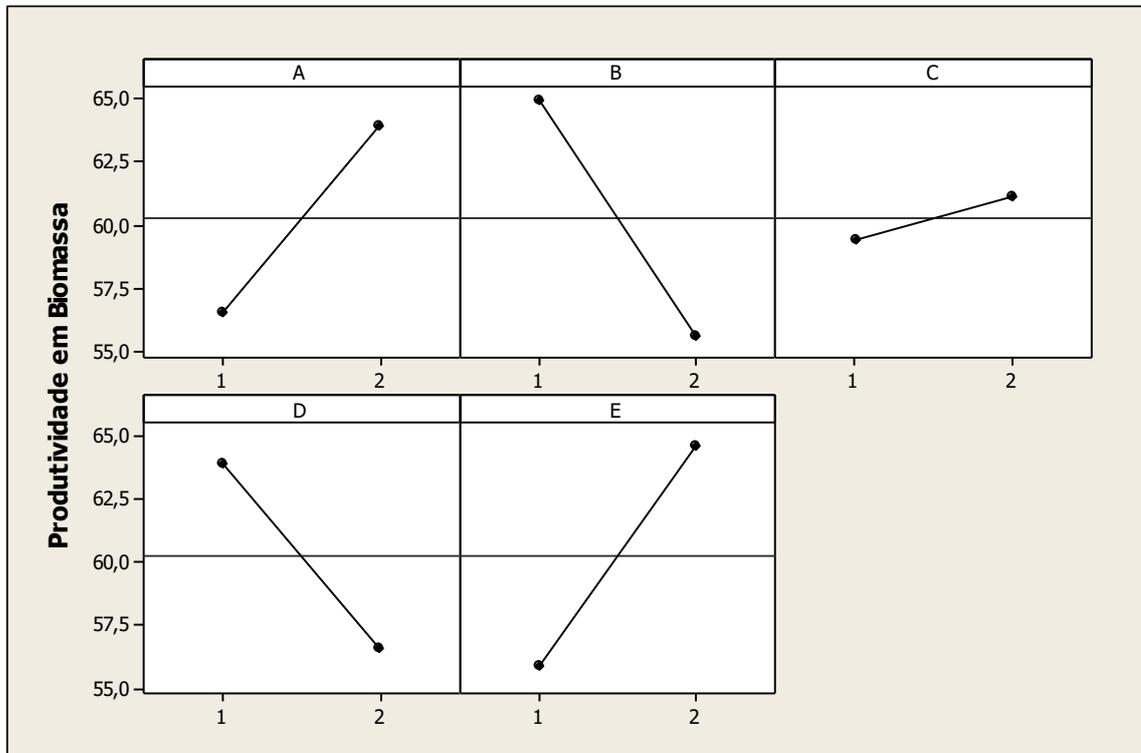
Exp	FATORES					Produtividade volumétrica em biomassa(mg/L-1.d-1)	
	A	B	C	D	E	Y1	Y2
1	1.00	1	1	1	1	52,15	60,56
2	1.00	1	2	2	2	70,97	62,03
3	1.00	2	1	1	2	48,44	76,21
4	1.00	2	2	2	1	49,11	33,06
5	2.00	1	1	2	2	49,62	79,98
6	2.00	1	2	1	1	71,03	73,15
7	2.00	2	1	2	1	38,36	69,67
8	2.00	2	2	1	2	49,24	80,66
9	1.50	1.50	1.50	1.50	1.50	59,45	72,53

Fonte: Autora.

A partir destes resultados utilizou-se o programa MINITAB para a análise da influência dos fatores sobre a variável resposta produtividade em biomassa.

Podemos notar na figura 16 e na Tabela 13 que os fatores Nitrato de sódio (B) no nível 1, Acetato de sódio (E) e Chorume (A) no nível 2 se apresentaram como mais relevantes

Figura 16 – Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a variável resposta da Produtividade volumétrica em biomassa.



Fonte: Autora.

Tabela 13 - Efeito dos Fatores sobre a Produtividade em Biomassa

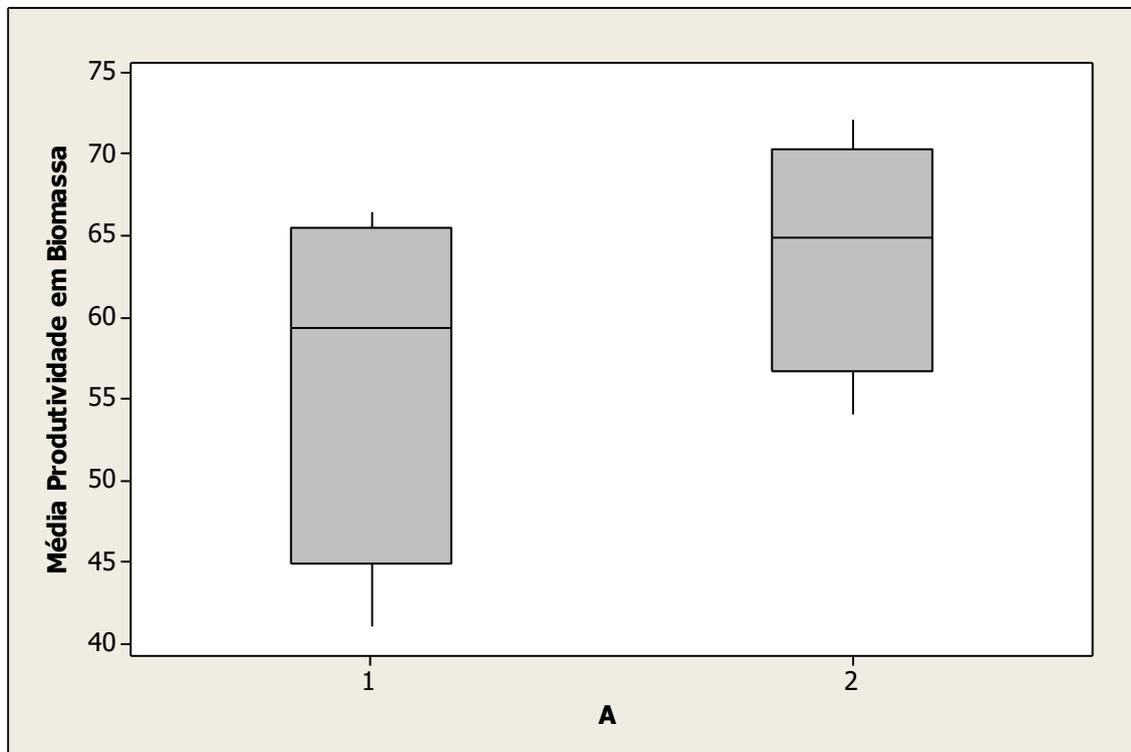
Nível	A	B	C	D	E
1	56,57	64,94	59,37	63,93	55,88
2	63,96	55,59	61,15	56,6	64,64
Delta	7,4	9,34	1,78	7,33	8,76
Rank	3	1	5	4	2

Fonte: Autora.

Para melhor visualização da variabilidade dos resultados foram plotados gráficos box-plot para os três melhores resultados.

Na figura 17 podemos observar uma variabilidade dos resultados no nível2, entre 42 e 67 ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), e no nível 1 uma variabilidade entre 55 e 73 ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), e sua mediana deu diferente em ambas, aproximadamente 59 e 66 ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) para o nível 1 e 2 respectivamente, o que significa que a presença de chorume exerce influência na produtividade de biomassa.

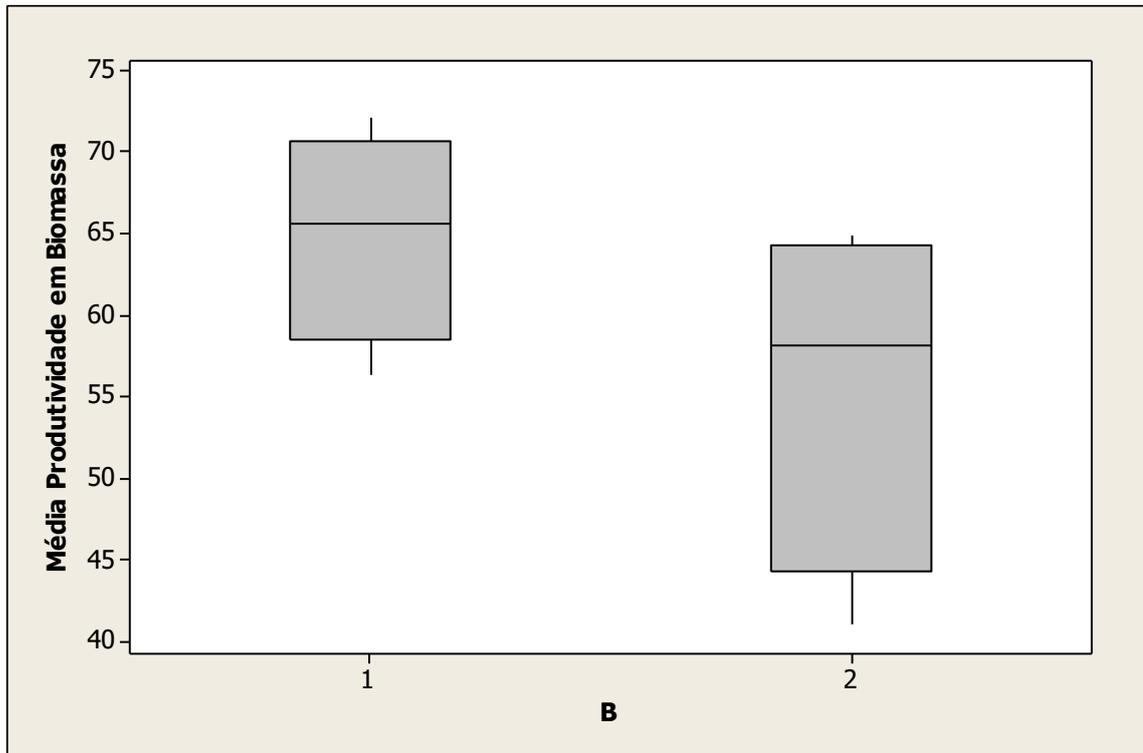
Figura 17 - Gráfico box-plot para a variável Chorume.



Fonte: Autora.

Na figura 18 temos um pequena variabilidade no nível 1, entre 56 e 73 ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), uma variabilidade maior para o nível 2, entre 42 e 65($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$). O valor da mediana deu diferente entre os níveis, o que significa que a presença de nitrato de sódio influência na produtividade de biomassa. Temos que no nível 1, sem nitrato, temos um maior valor da produtividade.

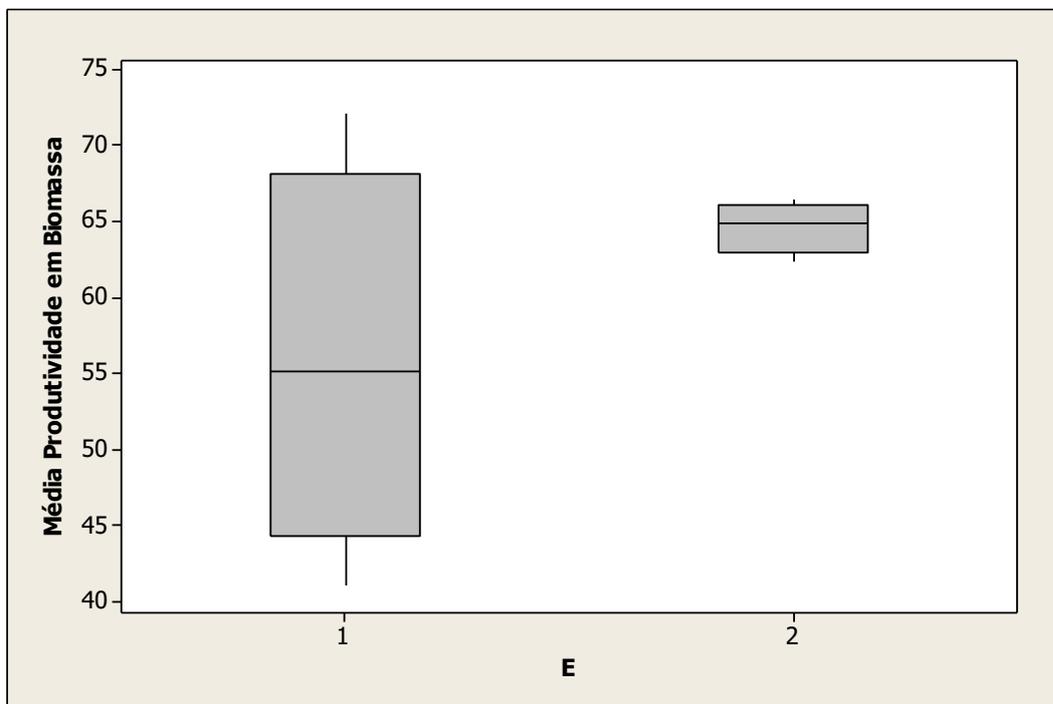
Figura 18 - Gráfico box-plot para a variável Nitrato de sódio.



Fonte: Autora.

Na figura 19 podemos observar uma grande variabilidade dos resultados no nível 1, entre 41 e 73 ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), e no nível 2 uma variabilidade pequena entre 64 e 68 ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), e sua mediana deu bem diferente, o que significa que a presença de Acetato de sódio exerce influência na produtividade de biomassa. Temos que no nível 2, com Acetato, temos um maior valor da produtividade de biomassa.

Figura 19 - Gráfico box-plot para a variável acetato de sódio



Fonte: Autora.

Pela análise de variância (ANOVA), todos os fatores e interações significativas possuem um grau de confiança maior que 95%, o nível de significância dado pelo p-valor é menor que 0,05. Observando a Tabela 14 pode-se notar que nenhum experimento foi estatisticamente significativo, mas os experimentos que contém acetato de sódio, chorume e ausência de nitrato de sódio foram relevantes, visto que o valor de F deu superior a 2. O chorume contém uma série de nutrientes (fósforo, carbono, nitrogênio e outros compostos orgânicos) que servem como fonte de nutrientes para as microalgas (HERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2019). O acetato de sódio fornece carbono orgânico que pode ser assimilado pelas microalgas permitindo que elas realizem a fotossíntese de maneira mais eficaz contribuindo para maior produtividade de biomassa, enquanto que a presença do nitrato de sódio, que já está presente no meio WC, pode ter causado toxicidade ou estresse nas microalgas devido a um excesso desse nutriente (BARROS *et al.*, 2017).

Tabela 14 - Análise de variância (ANOVA) para a produtividade em biomassa.

Fonte	GL	SQ	SMQ	F	P
A	1	109,453	109,453	2,27	0,271
B	1	174,55	174,55	3,62	0,197
C	1	6,349	6,349	0,13	0,752
D	1	107,515	107,515	2,23	0,274
E	1	153,46	153,46	3,18	0,216
Residual Error	2	96,485	48,243		
Total	7	647,812			

Fonte: Autora

Onde:

SQF: Soma Quadrática dos Fatores

GL: Graus de liberdade

SMQF: Soma média quadrática dos fatores

F: Teste F

p: Nível de significância.

5.4.2 PRODUTIVIDADE LIPÍDICA (MG.L⁻¹.D⁻¹)

Os resultados da produtividade em lipídios encontram-se na Tabela 15. A partir destes resultados utilizou-se o programa MINITAB para a análise da influência dos fatores sobre a variável resposta produtividade em lipídios, figura 19.

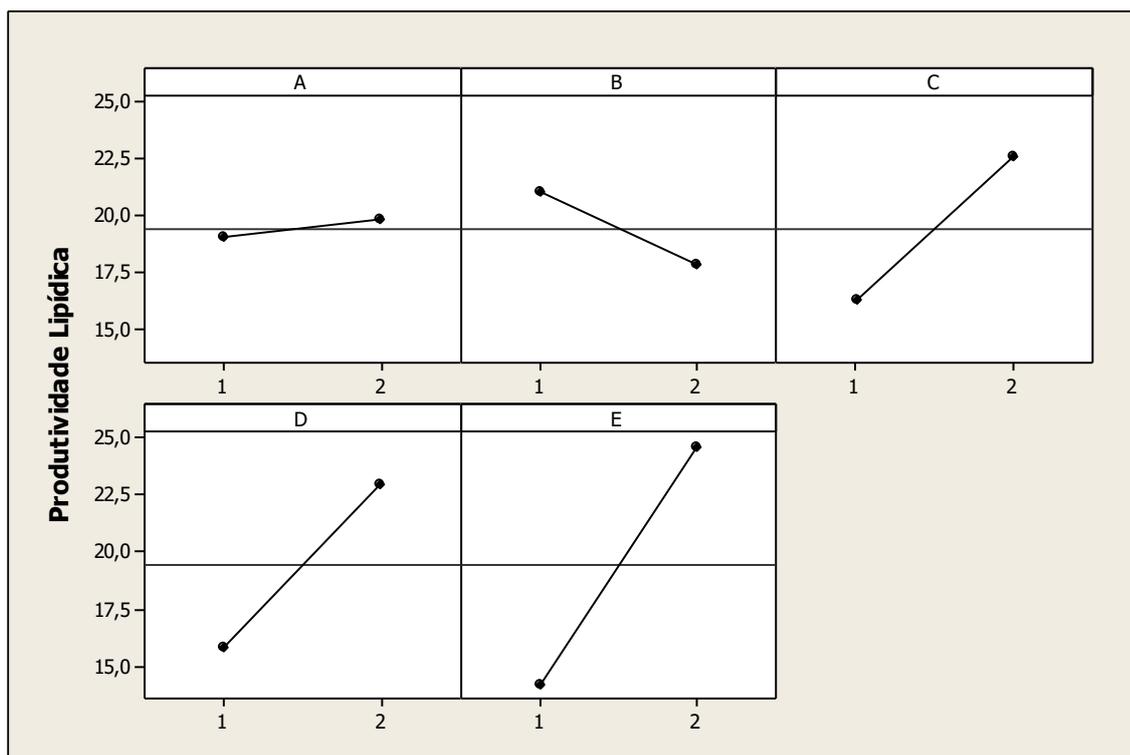
Tabela 15 - Resposta para determinação da Produtividade em lipídeos (mg.L⁻¹.d⁻¹).

Exp	FATORES					Produtividade Lipídica (mg/L.d)	
	A	B	C	D	E	Y1	Y2
1	1.00	1	1	1	1	8,55	8,44
2	1.00	1	2	2	2	59,51	23,52
3	1.00	2	1	1	2	10,27	21,82
4	1.00	2	2	2	1	11,61	8,50
5	2.00	1	1	2	2	13,8	22,39
6	2.00	1	2	1	1	12,7	19,11
7	2.00	2	1	2	1	17,21	27,72
8	2.00	2	2	1	2	18,78	26,93
9	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	11,45	10,00

Fonte: Autora .

Pode-se notar na figura 19 e na Tabela 16 que os fatores bicarbonato de sódio (C), melação (D) e acetato de sódio (E) todos no nível 2, ou seja, todos presentes se mostraram importantes para a maior produtividade de lipídios. O bicarbonato de sódio é usado como uma fonte de carbono que pode influenciar o metabolismo das microalgas e, conseqüentemente, aumentar a acumulação de lipídios. A presença de açúcares no melação pode induzir as microalgas a acumularem mais lipídios como resposta ao acúmulo de reservas energéticas, além de conter uma variedade de nutrientes que são benéficos para a microalga. O acetato de sódio por ser um meio de fornecer carbono também facilita o aumento a produção de lipídios (SARAL; AJMAL; RANGANATHAN, 2022).

Figura 20 - Gráfico dos efeitos dos fatores sobre a variável resposta da Produtividade em lipídios.



Fonte: Autora.

Tabela 16 - Efeito dos Fatores sobre a Produtividade Lipídica

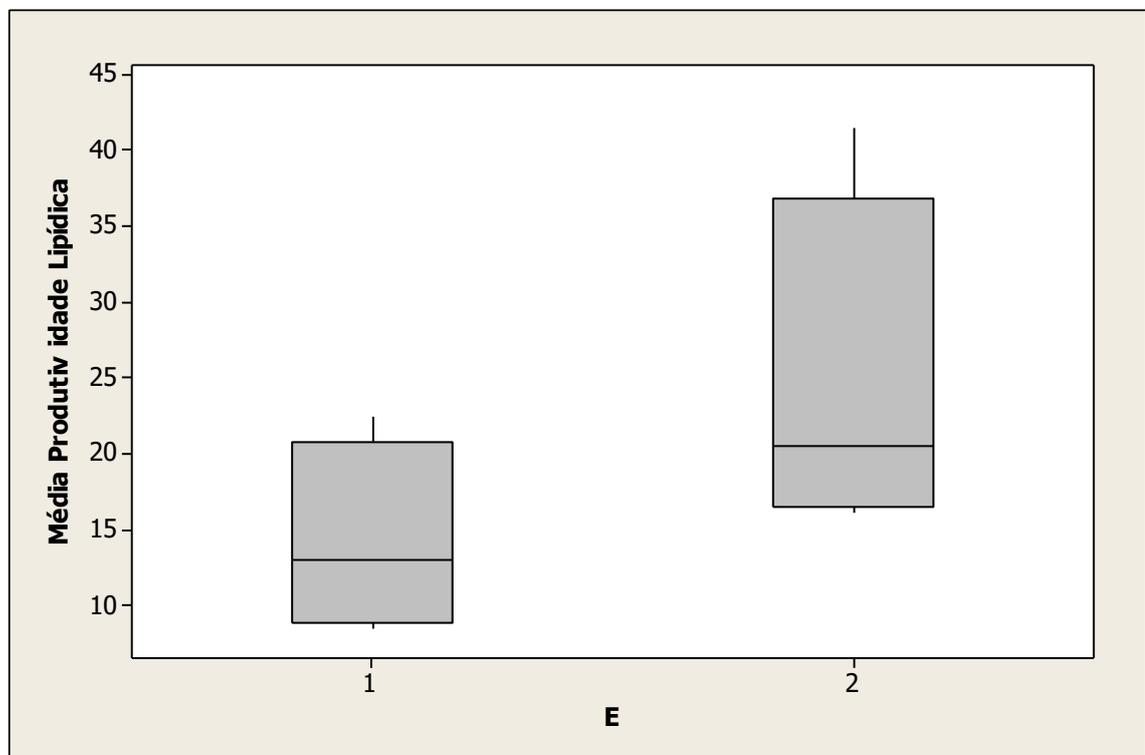
Nível	A	B	C	D	E
1	19,03	21	16,28	15,82	14,23
2	19,83	17,86	22,58	23,03	24,63
Delta	0,8	3,15	6,3	7,21	10,4
Rank	5	4	3	2	1

Fonte: Autora.

Para melhor visualização da variabilidade dos resultados foram plotados gráficos box-plot para o melhor resultado.

Na figura 21 podemos observar uma variabilidade dos resultados no nível2, entre 17 e 43 ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), e no nível 1 uma variabilidade entre 9 e 23 ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$), e sua mediana deu diferente em ambas, aproximadamente 13 e 23 ($\text{mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$) para o nível 1 e 2 respectivamente, o que significa que a presença Acetato de sódio exerce influência na produtividade em lipídeos.

Figura 21 - Gráfico box-plot para a variável acetato de sódio



Fonte: Autora.

Na tabela 17 temos a análise de variância (ANOVA), que indica o nível de significância e relevância como explicado anteriormente. Podemos notar que estatisticamente nenhum experimento deu significativo ($p\text{-valor} < 0,05$) e nem relevante ($F \geq 2$), esse resultado pode ter acontecido por erros de medição na coleta dos dados ou variações de temperatura do cultivo, visto que a microalga trabalhada é sensível a variações de temperatura.

Tabela 17 - Análise de variância (ANOVA) para a produtividade lipídica.

Fonte	GL	SQ	SMQ	F	P
A	1	1,283	1,28	0,01	0,937
B	1	19,797	19,797	0,12	0,759
C	1	79,499	79,499	0,5	0,555
D	1	103,89	103,89	0,65	0,506
E	1	216,143	216,143	1,35	0,366
Residual Error	2	321,093	60,547		
Total	7	741,704			

Fonte: Autora .

Onde:

SQF: Soma Quadrática dos Fatores

GL: Graus de liberdade

SMQF: Soma média quadrática dos fatores

F: Teste F

p: Nível de significância.

6 CONCLUSÕES

De acordo com resultados encontrados, obtiveram-se as seguintes conclusões:

O rendimento máximo da cultura foi de $6,050 \times 10^6$ células mL^{-1} com densidade celular final de $6,100 \times 10^6$ células mL^{-1} no experimento 8 (presença de: chorume, nitrato, bicarbonato e acetato de sódio).

A variação do pH não teve influência direta no crescimento da *B. Braunii*.

O experimento que teve maior concentração de biomassa foi o 6 (presença de : Chorume e Bicarbonato de sódio), com $0,793 \text{ g.L}^{-1}$.

O teor lipídico encontrado em 4 experimentos teve resultados bem satisfatórios: experimento 2 com 60,88% de teor lipídico, o 7 com 42,33% 8 com 35,76% e o experimento 5 com 27,9%. O experimento 2 tem a presença de bicarbonato de sódio, melão e acetato de sódio.

A produtividade em biomassa apresentou relevância nos dados (para um p-valor < 0,05) e seus maiores valores foram na presença de acetato de sódio e chorume, e na ausência de nitrato de sódio, tendo o seu máximo no experimento 6 com $72,09 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$. O experimento 6 tem a presença de bicarbonato de sódio e chorume.

A produtividade em lipídios não apresentou nem significância e nem relevância nos dados, mas a presença das variáveis bicarbonato de sódio, melão e acetato de sódio aparentam serem importantes para a maior produtividade de lipídios. O experimento com maior produtividade lipídica foi o experimento 2 com $41,52 \text{ mg.L}^{-1}.\text{d}^{-1}$.

Os fatores influenciam de formas diferentes cada variável de resposta analisada, então a depender do biocomposto desejado, tem-se diferentes combinações de fatores para maiores rendimentos.

, 7 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para trabalhos futuros temos como sugestão a aplicação de inteligência artificial, com redes neurais, usando reatores de tanque agitado (CSTR) em regime contínuo para indicar melhores rotas de crescimento da microalga e aumento da produtividade de biomassa e lipídeos.

REFERÊNCIAS

AL-HOTHALY, K. A. et al. Bio-harvesting and pyrolysis of the microalgae *Botryococcus braunii*. **Bioresource Technology**, v. 191, p. 117–123, 1 Sept. 2015.

AMARAL, M. S. **Cultivo da microalga marinha *Chlorella minutissima* em fotobiorreator integrado (coluna de bolhas - tubular) internamente iluminado visando à obtenção de biomassa para a produção de biodiesel**. 2018. 152 f. Tese (Doutorado em ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

AMARAL, M.S., **Cultivo da microalga marinha *Chlorella* sp. Como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel**. 2014. 109p. Dissertação (Mestrado em Ciências)– Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

AMIT; GHOSH, U. K. An approach for phycoremediation of different wastewaters and biodiesel production using microalgae. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 19, p. 18673–18681. 2018.

ANDERSEN, R. **Algal Culturing technique**. San Diego: Elsevier. 2005.

ANDERSEN, Robert A. (Ed.). **Algal culturing techniques**. Burlington: Elsevier, 2004.

ARAD, S.; LEVY-ONTMAN, O. **Red microalgal cell-wall polysaccharides: biotechnological aspects**. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 21, n. 3, p. 358–364, 2010.

AZEREDO, V. B. S. **Produção de Biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil**. 188 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

BANERJEE, A. et al. *Botryococcus braunii*: A renewable source of hydrocarbons and other chemicals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 3, p. 245–279, 2002.

BARROS, A; GUERRA, L. T; SIMÕES, M; SANTOS, Edgar; FONSECA, Diana; SILVA, Joana; COSTA, Luís; NAVALHO, João. **Mass balance analysis of carbon and nitrogen in industrial scale mixotrophic microalgae cultures**. *Algal research*, v.21, n.1, p. 35 - 41, 2017.

BARSANTI, L., GUALTIERI, . **Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology**. 2nd ed. Pisa Italy: CRC Press, 2006.

BASSO, L. C; BASSO, T. O; ROCHA, S. N. **Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation**. Biofuels production, São Paulo - Brazil, 2011.

BOBDE, K.; MOMIN, H.; BHATTACHARJEE, A.; AIKAT, K. (2019). Energy assessment and enhancement of the lipid yield of indigenous *Chlorella* sp. KA-24NITD using Taguchi approach. **Renewable Energy**, v.131, p.1226–1235. 2029.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE E. **Biotechnologia Industrial**. Fundamentos, 1.ed. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001.

BOSE, A. et al. Optimisation and performance prediction of photosynthetic biogas upgrading using a bubble column. **Chemical Engineering Journal**, v. 437, p. 134988,1 jun. 2022.

BRASIL, B. S. A. F.; GARCIA, L. C. Microalgas: Alternativas promissoras para a indústria. **Agroenergia em Revista**, dez. 2016.

BROWN, M. R.; BLACKBURN, S. I. Live microalgae as feeds in aquaculture hatcheries. **Advances in Aquaculture Hatchery Technology**, p. 117- 158e, 1 jan. 2013.

BRUNS, R. E.; BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos: pesquisa edesenvolvimento na ciência e na indústria** I. 2.ed. Campinas: Editora Unicamp, 2001.

CAI, T; PARK, S. Y ; LI, Y. Nutrient recovery from wastewater streams by microalgae: Status and prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 19, p. 360–369, 1 abr. 2013

CHEW, K. W. et al. Microalgae biorefinery: High value products perspectives. **Bioresource Technology**, v. 229, p. 53–62, 2013.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 294–306. 2007.

CHOJNACKA, K; NOWORYTA, A. Evaluation of Spirulina sp. Growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, 2004. P.461 – 465.

CHU, R. et al. A review on co-cultivation of microalgae with filamentous fungi: Efficient harvesting, wastewater treatment and biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, p. 110689. 2021.

DASGUPTA, C. N. et al. Recent trends on the development of photobiological processes and photobioreactors for the improvement of hydrogen production. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 19, p. 10218-10238, 2010.

DERMIBAS, A., DERMIBAS, M. F. *Algae Energy: Algae as a new source of biodiesel*. Turkey: Springer, 2009.

FERREIRA, G. F. et al. Biomass and lipid characterization of microalgae genera Botryococcus, Chlorella, and Desmodesmus aiming high-value fatty acid production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 5, p. 1675–1689, 2021.

FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437–448, 2013.

GIRALDO, J. A. P. et al. Economic and social aspects of biorefineries. **Recent Advances in Bioconversion of Lignocellulose to Biofuels and Value Added Chemicals within the Biorefinery Concept**. Brasília: Elsevier, 2020. p. 199–231.

GRIFFITHS, M. J.; HARRISON, S. T. L. **Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production**. *Journal of Applied Phycology*, v. 21, n. 5, 2009.

GÜNDÖLDÜ, T. K. et al. Experimental design methods for bioengineering applications. <http://dx.doi.org/10.3109/07388551.2014.973014>, v. 36, n. 2, p. 368–388. 2014.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, A. et al.. Wastewater-leachate treatment by microalgae: Biomass, carbohydrate and lipid production, **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.174, p.435-444, 2019.

JACKSON, B. A.; BAHRI, P. A.; MOHEIMANI, N. R. Repetitive non-destructive milking of hydrocarbons from *Botryococcus braunii*. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, p. 1229–1240. 2017.

JI, M. K.; YUN, H. S.; PARK, Y. T.; KABRA, A. N.; OH, I. H.; CHOI, J. **Mixotrophic cultivation of a microalga *Scenedesmus obliquus* in municipal wastewater supplemented with food wastewater and the flue gas CO₂ for biomass production**. *Journal of Environmental Management*, v. 159, n. 2, p. 115–120. 2015.

KAMARUDDIN, M. A. et al.. Sustainable treatment of landfill leachate, **Applied Water Science**, v. 5, p. 113–126, 2015.

KUMAR, A.; ERGAS, S.; YUAN, X.; SAHU, A.; ZHANG, Q.; DEWULF, J.; MALCATA, F. X.; VAN LANGENHOVE, H. Enhanced CO₂ fixation and biofuel production via microalgae: recent developments and future directions. **Trends in Biotechnology**, v. 28, n. 7, p. 371–80, 2010.

LEE, R. E. *Phycology*. United States of America: Cambridge University Press. 2008.

LEPAGE, G.; Roy, C. C. Improved recovery of fatty acid through direct transesterification without prior extraction or purification. **Journal of Lipid Research**. v.25, n.4, 1984.

LIU, Y. et al. Review of waste biorefinery development towards a circular economy: From the perspective of a life cycle assessment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, p. 110716. 2021.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas – princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006. ISBN 8576561131.

LOWREY, J.; BROOKS, M. S.; MCGINN, P. J. Heterotrophic and mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production in agricultural wastewater and associated challenges – a critical review. **Journal of applied phycology**, v.13, n.1, 2015.

MAHAMUNI, N. N.; ADEWUYI, Y. G. Application of taguchi method to investigate the effects of process parameters on the transesterification of soybean oil using high frequency ultrasound. **Energy and Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2120–2126, 18 mar. 2010.

MENETREZ, M. Y. An overview of algae biofuel production and potential environmental impact. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 13, p. 7073–7085. 2012.

MISHRA, B.; TIWARI, A.; MAHMOUD, A. E. D. Microalgal potential for sustainable aquaculture applications: bioremediation, biocontrol, aquafeed. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 1, p. 1–13. 2022.

MORAIS, KELLI C. C. **Análise e desenvolvimento de aquicultura da microalga *Phaeodactylum tricornutum* em crescimento autotrófico e mixotrófico em fotobiorreatores compactos**. 98 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

NUNE, T. **Biodiesel a partir de Microalgas**. Acesso em: 1 mai. 2022
Operational Parameters of an Unconventional Integrated and Illuminated Internally Photobioreactor (ILI-PBR) for the Batch Autotrophic Cultivation of the *Chlorella minutissima*, Using the Taguchi Method. **Applied Biochemistry And Biotechnology**. New York: Springer, v. 191, n. 1, p. 245-257, 2020. Acesso em: <http://hdl.handle.net/11449/197702>.

ORTENZO, Y. T., AMARAL, G. G., ALMEIDA, S. D., OLIVEIRA, E. C. Cultivo de microalgas utilizando resíduos agroindustriais para a produção de biocombustíveis: perspectivas e desafios. **Bioenergia em revista: diálogos**, v.5, n.1, 2015.
PLÖHN, M. et al. Wastewater treatment by microalgae. **Physiologia Plantarum**, v.173, n. 2, p. 568–578, 2021.

PODEVIN, M; FRANSCISCI, D; HOLDT, S. L.; ANGELIDAKI, I. **Effect of nitrogen source and acclimatization on specific growth rates of microalgae determined by a high throughput in vivo microplate autofluorescence method**. **Journal of applied Phycology**, v.27, n.1, p.1415-1423, 2015.

RAHEEM, A. et al. A review on sustainable microalgae based biofuel and bioenergy production: Recent developments. **Journal of Cleaner Production**, v. 181, p. 42–59. 2018.

RAMARAJ, R. et al. Emer Life Sci Res. **Direct Transesterification of Microalga *Botryococcus braunii* Biomass for Biodiesel Production**. [s.d.].v.2, n.1, p.1-7,

2026.

RAWAT, I. et al. Dual role of microalgae: Phycoremediation of domestic wastewater and biomass production for sustainable biofuels production. **Applied Energy**, v. 88, n. 10, p.3411–3424. 2011.

RICHMOND, A. Handbook of microalgae culture: Biotechnology and applied phyecology. **Analytical biotechnology**, v. 296, n.2, 2004.

RUANGSOMBOON, S. Effect of light, nutrient, cultivation time and salinity on lipid production of newly isolated strain of the green microalga, *Botryococcus braunii* KMITL 2. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 261–265. 2012.

RUANGSOMBOON, S. Effects of different media and nitrogen sources and levels on growth and lipid of green microalga *Botryococcus braunii* KMITL and its biodiesel properties based on fatty acid composition. **Bioresource technology**, v.191, n.2, p. 377-384, 2015.

RUIZ, J. et al. Towards industrial products from microalgae. **Energy & Environmental Science**, v. 9, n. 10, p. 3036–3043. 2016.

SARAL, J. S.; AJMAL, R. S.; RANGANATHAN, P. Bioeconomy of hydrocarbon biorefinery processes. **Hydrocarbon Biorefinery: Sustainable Processing of Biomass for Hydrocarbon Biofuels**, ResearchGate p. 355–385. 2022.

SCHMITZ, R., MAGRO, C. D., COLLA, L. M. Aplicações ambientais de microalgas. **CIATEC - UPF**, v.4, n.1, p 48-60, 2012.

SHAH, M. R. et al. Microalgae in aquafeeds for a sustainable aquaculture industry. **Journal of Applied Phycology** 2017 30:1, v. 30, n. 1, p. 197–213, 5 set. 2017.

SHEEHAN, J.; DUNAHA, Y. T.; BENEMANN, J.; ROESSLER, P. A Look Back at the U.S. Department of Energy's Aquatic Species Program - **Biodiesel from Algae**. U.S. Department of Energy's Office of Fuels Development. National Renewable Energy Laboratory. NREL/TP-58024190, 1998.

SINGH, S. P.; SINGH, P. Effect of temperature and light on the growth of algae species: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 50, p. 431–444. 2015.

SUTHAR, S.; VERMA, R. Production of *Chlorella vulgaris* under varying nutrient and abiotic conditions: A potential microalga for bioenergy feedstock, **Process Safety and Environmental Protection** 113, 141–148, 2018.

TIWARI, A.; MARELLA, T. K. Potential and Application of Diatoms for Industry-Specific Wastewater Treatment. **Application of Microalgae in Wastewater Treatment**, p. 321–339, 2019.

USTAOGU, A. et al. Analysis of vapor compression refrigeration cycle using advanced exergetic approach with Taguchi and ANOVA optimization and refrigerant selection with environmental concerns by TOPSIS analysis. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 52, p. 102182. 2022.

VAIDYA, G. et al. Production of biodiesel from phoenix sylvestris oil: Process optimisation technique. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 26, p. 100636. 2022.

VENKATA M., S. et al. Waste biorefinery models towards sustainable circular bioeconomy: Critical review and future perspectives. **Bioresource Technology**, v. 215, p. 2–12. 2016.

YANG, H. J.; HWANG, P. J.; LEE, S. H. A study on shrinkage compensation of the SLS process by using the taguchi method. **International Journal of Machine Tools and Manufacture**, v. 42, n. 11, p. 1203–1212, 2002.

YEN, H-W.; HU, C-I.; CHEN, C-Y.; HO, S-H.; LEE, D-J.; CHANG, J-S. **Microalga based biorefinery – From biofuels to natural products**. *Bioresource Technology*, v. 135, p. 166–174, 2013.

ZORN, S. M. F.E.; PEDRO, G. A.; AMARAL, M.S.; LOURES, C. C. A.; SILVA, M. B. Avaliação dos fatores envolvidos na extração de lipídios da biomassa da microalga *Chlorella minutissima* solventes. **HOLOS**, v.2, p. 66 – 79, 2017. ISSN 1807-1600.